Aus dem Hygienischen Institut der Universität Marburg
Direktor: I. V. Prof. Dr. Schmidt

Ein Beitrag zur Methodik der Keimzählung und zur Frage der Standardisierung von Vaccinen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde der Hohen Medizinischen Fakultät der Philipps - Universität zu Marburg a. d. Lahn

Vorgelegt von
ERICH FISCHER
Zahnarzt aus Meiningen

Marburg a. d. Lahn

1931

Aus dem Hygienischen Institut der Universität Marburg
Direktor: I. V. Prof. Dr. Schmidt

Ein Beitrag zur Methodik der Keimzählung und zur Frage der Standardisierung von Vaccinen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde der Hohen Medizinischen Fakultät der Philipps - Universität zu Marburg a. d. Lahn

Vorgelegt von
ERICH FISCHER
Zahnarzt aus Meiningen

Marburg a. d. Lahn

1931

Angenommen von der Medizinischen Fakultät Marburg
am 10. Juli 1930

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Referent: Herr Professor Dr. H. Schmidt

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinem Vater in Dankbarkeit
gewidmet!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547924_0089

In der modernen Medizin wird bei zahlreichen Erkrankungen bakteriologischen Ursprungs die Vaccinetherapie angewendet. Die hierzu gebrauchten Impfstoffe bestehen aus Aufschwemmungen abgetöteter Bakterien in Flüssigkeiten (meistens physiol. Kochsalzlösung mit Phenolzusatz). H. Dold schreibt in seinen kritischen Betrachtungen über Keimzahlbestimmung, daß im Augenblick der Herstellung diese suspendierten Bakterien die einzigen Träger der antigenen Wirksamkeit des Impfstoffes sind, aber kurze Zeit danach eine Änderung dieses Zustandes dadurch eintritt, daß bei Bakterien, die eine Schleimhülle besitzen, diese Hülle durch die Suspensionsflüssigkeit gelöst wird, sich in ihr verteilt und damit die Flüssigkeit selbst auch antigene Wirksamkeit erhält. Durch Diffusion beginnen außerdem spezifisch wirkende Stoffe aus den Bakterien in die umgebende Flüssigkeit zu treten, was durch die nach der Abtötung bald auftretende Autolyse der Zelleiber unterstützt wird. Infolgedessen stellen die Bakterien nicht mehr allein das wirksame Agens eines Impfstoffes dar, es wird vielmehr ein Teil der Wirkung dem durch die beschriebenen Vorgänge im Medium gelösten Antigen zuzuschreiben sein. Nach dem Gesagten wäre also die Bewertung eines Vaccins nach der Bestimmung seines Keimgehaltes unsicher. Da aber keine andere Möglichkeit besteht, ein Bild von dem Wirkungsgrad eines Impfstoffes zu bekommen, der berücksichtigt werden muß, will man der individuell sehr verschiedenen Reaktionsfähigkeit der Impflinge gerecht werden, so ist als Vergleichsfaktor doch die Keimzahl zu Hilfe zu nehmen. Zu diesem Zweck ist eine Keimzählungsmethode erforderlich, die exakte Resultate liefert, schnell und leicht auszuführen ist, und auch jederzeit nachprüfbar sein muß. Die zuletzt genannte Forderung ist deshalb besonders wichtig, weil die Impfstoffe meistens fabrikmäßig in bakteriologischen Instituten hergestellt werden. Wenn daher eine schnell ausführbare Methode zur Zählung gebraucht werden kann, so bedeutet das eine große Erleichterung und Zeitersparnis bei Herstellung und Nachprüfung. Wie schon erwähnt, wird der Wirkungs-

grad eines Vaccins fast ausschließlich nach dem Gehalt an Keimen die inbezug auf ihre Wirksamkeit und ihre biologischen Eigenschaften genau bekannt sind, bestimmt. Handelt es sich jedoch um die Herstellung eines vollkommen neuen Impfstoffes oder um die Verwendung eines bis dahin zu diesem Zweck noch nicht gebrauchten Bakterienstammes, so muß seine Wirkung zunächst durch den Tierversuch darauf untersucht werden, ob die Einverleibung ohne nachfolgend auftretende nennenswerte Reaktionen in Form von Nekrosen, starker Schmerzhaftigkeit oder Schwellungen vertragen wird. Da es sich also bei allen Impfstoffen um Suspensionen abgetöteter Bakterien in einem flüssigen Medium handelt, scheiden zur Bestimmung der Keimzahl alle Methoden aus, die nur zur Feststellung der Zahl lebender Keime brauchbar sind, d. h., bei denen ihre Entwicklungsfähigkeit überhaupt erst die Zählung ermöglicht.

Die ursprünglichste dieser Methoden ist von Miquel angegeben, der das zu untersuchende Substrat so lange in flüssigen Nährmedien verdünnt, bis ein Probierröhrchen steril bleibt und dadurch der Schluß möglich ist, daß in das Röhrchen mit der nächst schwächeren Verdünnung nur noch ein lebensfähiger Keim übertragen wurde. Mit Hilfe des Verdünnungsfaktors wird nun die Keimzahl der unverdünnten Suspension errechnet. Diese Methode birgt, wie die nach demselben Prinzip aufgebaute „Halbierungsmethode" von Krompholz, zahlreiche Fehlerquellen in sich, die z. T. auch bei exaktester Arbeit nicht auszuschalten sind und das Resultat völlig unbrauchbar machen können. Sie wird deshalb nicht mehr angewendet.

Am gebräuchlichsten zur Zählung lebensfähiger Keime ist wohl das Koch'sche Plattenverfahren. Auf die Methodik dieser Zählart soll hier nicht eingegangen werden, es sei hier nur auf ihre Fehlerbreite hingewiesen, die bedeutend größer ist, als allgemein angenommen wird. Hierüber sind von Muntsch eingehende Untersuchungen angestellt und beschrieben worden. Muntsch zählt verschiedene Bakteriensuspensionen in fortschreitender Verdünnung nach dem erwähnten Verfahren und rechnet die Ergebnisse auf das unverdünnte Substrat um. Die hierüber aufgestellten Tabellen zeigen die außerordentlich großen Differenzen zwischen den aus den verschiedenen Verdünnungen

resultierenden Keimzahlen. Eine weitere Versuchsreihe, bei der die Verdünnungen nicht wie bei der ersten progressiv hergestellt waren, sondern ohne gegenseitigen Zusammenhang blieben, ergibt wesentlich bessere Resultate, wenn auch die Fehlerbreite immer noch so groß war, daß man das Verfahren nicht einmal als annähernd genau bezeichnen könnte. Immerhin scheint doch durch die erwähnten Versuche erwiesen, daß eine Hauptfehlerquelle in dem Verdünnungsvorgang liegt. Um diese zu vermeiden, wurden die Verdünnungen zu den weiter unten beschriebenen Zählungen in der Zählkammer ebenfalls jedesmal von der Stammsuspension ausgehend, also unabhängig von einander hergestellt.

Zur Zählung lebender und abgetöteter Keime wird auch heute noch vorwiegend die Wright'sche Methode angewendet. H. Dold weist in seiner schon oben erwähnten Arbeit auf die Fehlerquellen dieser Methode hin, die z. B. dadurch entstehen können, daß die zum Vergleich herangezogene Blutkörperchenzahl Schwankungen unterworfen ist, oder daß beim Abspülen auch fixierter Präparate unbestimmte Mengen von Erythrocyten und Bakterien mit fortgeschwemmt werden, daß weiterhin zahlreiche Keime durch Blutkörperchen verdeckt und deshalb beim Zählen nicht berücksichtigt werden können. Eine andere Fehlerquelle liegt in der verschiedenen Färbbarkeit der Keime, was besonders berücksichtigt werden muß, wenn es sich um ältere Impfstoffe handelt. Hierüber angestellte eigene Versuche mit mehrere Monate alten Suspensionen zeigten deutlich diese Schwierigkeit. So waren z. B. bei zahlreichen mit größtmöglicher Exaktheit hergestellten Präparaten die Bakterien derart schwach gefärbt, daß eine Zählung unmöglich war. Weitere Fehler können dadurch entstehen, daß Farbstoffniederschläge als Keime angesehen und mitgezählt werden. Auch nach Untersuchungen verschiedener anderer Forscher muß man bei dieser Methode mit einer großen Fehlerbreite rechnen, meist kommt es zu einer Unterschätzung von 100—200%, was bei der Fülle der Fehlermöglichkeiten leicht erklärlich ist.

Ähnlich ist es bei der Modifikation der Wright'schen Methode nach Fries, nur wird hier die zuerst genannte Fehlerquelle dadurch vermieden, daß man eine in der Zählkammer

lege artis ausgezählte Hefesuspension als Vergleichsflüssigkeit benutzt.

Sommer färbt das Gemisch von Hefe und Bakterien vor dem Ausstreichen auf den Objektträger und verhütet dadurch Fehler, die durch das Abspülen entstehen. Auf diese Weise soll eine Fehlerbreite von 5% nicht überschritten werden.

Eine andere Art, den Keimgehalt eines Impfstoffes festzustellen, ist der Vergleich der Bakterienaufschwemmung mit einer Standard-Aufschwemmung derselben Bakterienart inbezug auf den Trübungsgrad. Derartige Methoden sind von zahlreichen Autoren angegeben worden. Sie können aber alle nur als Schätzung angesehen werden, dürften den Ansprüchen der Praxis aber oft genügen, zumal sie größtenteils einfach zu handhaben sind. Bekannt sind die Nephelometer von Kleinmann, Mecklenburg und der Turbidometer nach Dold. Versuche, die mit dem von v. Hahn konstruierten Trübungsmesser angestellt wurden, haben zu keinem Ergebnis geführt, da bei diesem Apparat abgebeugtes mit durchfallendem Licht verglichen werden muß und so eine Übereinstimmung zwischen der Trübung der Standardsuspension und der zu untersuchenden niemals auch nur annähernd festgestellt werden kann.

Auf ähnlichem Prinzip wie das Turbidometer beruht das Verfahren von Wikulil und S. L. Gates, die die Keimzahl aus der Eintauchtiefe einer Chromdrahtöse in die Bakteriensuspension bestimmen. Es ist klar, daß derartige Apparate nur eine Schätzung des Keimgehaltes gestatten, da ja die Feststellung des Trübungsgrades und damit die Bestimmung der Keimzahl von der individuellen Empfindlichkeit für Trübungsunterschiede des Untersuchenden abhängt, abgesehen von den Fehlern, die durch den Verdünnungsvorgang usw. entstehen können.

Bei dem Moll'schen Trübungsmesser ist daher versucht worden, durch zwei hochempfindliche Thermosäulen, die die Aufgabe des menschlichen Auges übernehmen, diese Fehlerquelle auszuschalten. Allen diesen optischen Methoden der Trübungsmessung ist gemeinsam, daß sie mit einer Standard-Trübung arbeiten, die jedoch vorher durch ein wirkliches Zählverfahren geeicht sein muß. So genau auch diese optischen Verfahren arbeiten beim Vergleich zweier Trübungen — und für

alle praktischen Bedürfnisse reicht diese Genauigkeit aus —, so darf doch diese Genauigkeit nicht über den primären, evt. sehr großen Fehler in der Standardisierung der Trübung hinwegtäuschen.

Andere Autoren haben versucht, durch Wägung der Kulturmasse ihren Keimgehalt zu bestimmen. Derartige Methoden sind von Bujwid und Ficker ausgearbeitet worden.

Krompholz und W. Lorenz haben eine „exakte Methode der mikrobiellen Titerbestimmung" veröffentlicht. Die Berechnung des Keimgehaltes geschieht hier mit Hilfe der Wahrscheinlichkeitsrechnung.

Auf einem anderen Prinzip ist die Methode von Rosenthal aufgebaut, die von G. Dichtl nachgeprüft und empfohlen wurde. Die Keimzahl der Bakterienaufschwemmung wird nach diesem Verfahren dadurch ermittelt, daß abgemessene Mengen der Suspension in ein Zentrifugierröhrchen gefüllt werden, das unten zu einer graduierten Kapillare ausgezogen und mit Quecksilber verschlossen ist. Das Röhrchen wird so lange scharf zentrifugiert, bis sich die in dem Substrat enthaltenen Keime in der Kapillare abgesetzt haben. Die Höhe des Sediments wird abgelesen und daraus die Keimzahl errechnet.

H. Schmidt benutzt zu seinem Verfahren, die maximalen und minimalen Keimzahlwerte von Bakteriensuspensionen zu bestimmen, ein ähnliches Prinzip. Durch die vorliegende Arbeit soll dieses Verfahren, das Schmidt zunächst nur für den Staphylococcus albus durchgeführt hat, für die in Betracht kommenden Bakterienarten im einzelnen weiter ausgebaut werden. Es soll daher zunächst auf die Arbeit von Schmidt näher eingegangen werden.

Die zu untersuchende Bakterienaufschwemmung wird in einer unten verschlossenen Glaskapillare zentrifugiert und aus der Höhe der abgesetzten Bakteriensäule einerseits und der Höhe der gesamten Flüssigkeitssäule andererseits die Keimzahl errechnet. Technisch geht man bei dem Verfahren folgendermaßen vor: Eine ca. 10—12 cm lange (eine größere Länge verbieten die handelsüblichen Zentrifugen), ungefähr 0,8 cm dicke Glaskapillare mit einem Lumen von 0,02—0,03 mm Radius wird an der einen Seite mit einem Gummisauger, wie er zu Pipetten

gebraucht wird, verschlossen. Nun saugt man zunächst etwas Quecksilber in die Kapillare auf und läßt unter Vermeidung von Luftblasen die Bakterienaufschwemmung folgen, bis das Quecksilber an dem mit dem Sauger verschlossenen Ende angelangt ist. Dann verschließt man die Kapillare mit dem Finger und entfernt vorsichtig den Gummisauger. Schließlich wird Siegellack erwärmt und auf das ebenfalls leicht erwärmte mit Quecksilber verschlossene Ende der Kapillare fest angedrückt, sodaß etwas von dem Siegellack in das Lumen der Kapillare eindringt. Da sich das Quecksilber beim Erwärmen ausdehnt und z. T. aus der Kapillare heraustritt, ist darauf zu achten, daß genügend viel Quecksilber aufgesaugt wird, jedoch nicht zuviel, da sonst nicht genug Flüssigkeit aufgenommen werden könnte und die Messung der auszentrifugierten Bakteriensäule durch ihre geringe Höhe erschwert werden würde. Bei Übung genügt schon bis 0,5 cm, meistens ist 1 cm die beste Höhe. Durch das Quecksilber soll die Bakteriensäule möglichst scharf begrenzt werden, was durch Siegellack allein nicht zu erreichen ist. Die Kapillare wird nun zentrifugiert und zwar so lange, bis die abgesetzte Bakteriensäule sich nicht mehr sichtbar vergrößert, sodaß angenommen werden kann, daß sämtliche Keime ausgeschleudert sind. Am besten eignen sich Zentrifugen mit einer Tourenzahl von mindestens 3000 pro Minute. in denen die Kapillaren ca. zwei Stunden zentrifugiert werden müssen, bis alle Bakterien in einem Minimum vorhanden sind. Bei einer größeren Tourenzahl verringert sich diese Zeit wesentlich, da die Sedimentierungsgeschwindigkeit bedeutend gesteigert würde. Nun nimmt Schmidt an, daß durch das scharfe Zentrifugieren die Bakterien bis zu einem gewissen Grade deformiert werden, daß also in der abgesetzten Bakteriensäule mehr Keime enthalten sind, als sich aus dem Volumen der Säule und der Größe der Bakterien berechnen lassen, wenn nur engste Packung, aber gleichbleibende Form vorausgesetzt wird. Er berechnet daher, um die wirkliche Keimzahl zu ermitteln, die Zahl, die sich ergibt, wenn keine Deformierung eintritt, die also — engste Pakkung vorausgesetzt — die Minimalzahl darstellen würde gegenüber der Maximalzahl, die bei der Berechnung unter Annahme völliger Deformierbarkeit, d.h. bei restloser Verdrängung

der Flüssigkeit aus den Bakterienzwischenräumen, resultiert. Das arithmetische Mittel aus beiden Zahlen nimmt er als Anzahl der in der Bakteriensäule enthaltenen Keime an. Die Minimalzahl ist natürlich rechnerisch nur genau zu ermitteln, wenn es sich um kugelförmige Bakterien handelt, also etwa um Kokken, da hier die Zwischenräume, die bei engster Packung und gleichbleibender Form entstehen, mathematisch erfaßt werden können. Da zunächst die Masse eines Staphylococcus albus bekannt sein muß, ermittelt Schmidt das spezifische Gewicht und daraus mit Hilfe der Stokes'schen Formel der Fallgeschwindigkeit kleinster Kugeln in einer Flüssigkeit den Radius. Die Rechnung ergibt für den Radius eines Staphylococcus 0,37 μ. Unter der Annahme, daß Bakterien in flüssigen Medien stets von einer fest anhaftenden Flüssigkeitshülle umgeben sind, die sich auch durch stärkstes Zentrifugieren nicht löst, vergrößert sich der Radius der Kugel etwas und wird mit 0,4 μ angenommen. Es folgt nun die Berechnung, wieviel Kugeln mit dem Radius ϱ in den Zylinderraum $\pi r^2 h$, den die Bakteriensäule darstellt, hineingehen. Die Rechnung gestaltet sich einfach bei der Annahme völliger Deformierbarkeit. Die Zahl ist durch den Quotienten von $\pi r^2 h$ und $\frac{4}{3}\pi\varrho^3$, dem Inhalt der Kugel gegeben und ist die Maximalzahl. Werden die Kokken als starr betrachtet, so müssen die Zwischenräume berücksichtigt werden, die bei engster Packung entstehen. Bei gleicher Größe sämtlicher Kugeln berührt jede von ihnen im Raum zwölf andere. Man kann sich daher die Kugeln mit regulären Rhombendodekaedern umgeben denken, deren Flächen einander dekken und die so den Raum restlos ausfüllen. Da die Formel für den Inhalt eines Rhombendodekaeders durch den Radius der eingeschriebenen Kugel ausgedrückt $4\varrho^3\sqrt{2}$ ist, so gehen davon in den Zylinderraum $\pi r^2 h$ $\frac{\pi r^2 h}{4\varrho^3\sqrt{2}}$ hinein, wodurch die Zahl der Kokken bei engster Packung, aber starrer Form, also die Minimalzahl ausgedrückt wäre. Die beiden so gefundenen Größen beziehen sich auf die Anzahl der Keime, die vor dem Zentrifugieren in dem Zylinderraum $\pi r^2 H$ enthalten waren, wenn H die Höhe der gesamten Flüssigkeitssäule vom Quecksilber-

spiegel an gemessen, bedeutet. Die gefundenen Ausdrücke müssen nun durch $\pi r^2 H$ dividiert werden, wodurch die Zahl der Keime pro ccm gefunden wird. Hierbei fällt der Radius r der Kapillare aus der Rechnung heraus, was deshalb günstig ist, weil man so verschiedenartige Kapillaren, ohne deren Radius zu messen, benutzen kann, wenn sie nur wegen der Viscosität nicht zu eng und wegen der Meßbarkeit der Länge der Bakteriensäule nicht zu weit sind. Die Abmessung der Bakterien- und Flüssigkeitssäule geschieht zweckmäßig mit einem Präzisionsmaßstab, auf dem halbe Millimeter eingezeichnet sind, und dessen Teilstriche schwarz auf weißem Grund markiert sind. Man kann so noch $^1/_{10}$ mm mit ausreichender Genauigkeit abschätzen, da das Kapillarrohr gleichzeitig als Vergrößerungslinse dient.

Schmidt gibt als Maximum der Fehlerbreite 0,05 mm an. Diese Zahl wurde durch meine Versuche bestätigt, kommt aber für das Resultat nicht sehr in Betracht, besonders dann nicht, wenn man von derselben Testflüssigkeit mehrere Kapillaren zentrifugiert, das Mittel der gefundenen Maße nimmt und so diese Fehlerquelle ausschalten kann. Jedenfalls genügt die Abmessung mit einem Maßstab vollkommen und macht das Mikroskop überflüssig, wenn man nur mit genügender Sorgfalt vorgeht und auch die parallaktischen Verschiebungen, die durch das Glas entstehen, beachtet. Schmidt sucht durch seine Arbeit vor allem die Reproduzierbarkeit seines Verfahrens darzulegen und stellt mehrere Tabellen auf, die die Keimzahlen abgestufter Verdünnungen aus derselben Suspension wiedergeben. Die Fehler sollen dabei stets unter 10% bleiben, eine Zahl, die auch bei den eigenen Versuchen nicht überschritten wurde. Praktische Bedeutung wird die Methode aber erst erlangen, wenn ihre Resultate mit denen einer anderen verglichen werden können, die verläßliche Werte liefert. Da die genaueste, wenn auch umständlichste Keimzählungsart die Auszählung in der Zählkammer ist, wurden die Keimzahlen der folgenden Versuchsreihen alle nach dieser Methode festgestellt.

Die Versuche wurden begonnen mit einer Suspension von Saccharomyces cerevisiae in carbolisierter Kochsalzlösung. Hefezellen wurden deshalb gewählt, weil sie wegen ihrer Größe leicht

mikroskopisch zu zählen sind und eine andere Gestalt haben als Kokken oder Stäbchen und deshalb eine Berechnung gestatten, die von der durch Schmidt für Kokken ausgeführten abweicht, wodurch eine Kontrolle der Frage gegeben wird, ob die Berechnung überhaupt durchführbar ist, und ob sie brauchbare Resultate liefert. Zunächst wurden Untersuchungen darüber angestellt, wieviel Zählkammern und bei welcher Verdünnung man zweckmäßig zählen muß, um eine Keimzahl zu erhalten, die der wahren am ehesten entspricht. Die Klarstellung dieser Frage erschien deshalb besonders wichtig, weil die Resultate im folgenden mit einem möglichst genauen Standard verglichen werden müssen, und die Rechnung z. T. auf dem in der Zählkammer gefundenen Keimzahlwert aufgebaut ist. Die Zählung wurde mit der Thoma-Zeiß'schen Zählkammer, deren Tiefe 0,1 mm beträgt und der Zählkammer nach Bürker mit einer Tiefe von 0,02 mm, aber einem 9 mal größeren Netz ausgeführt. Als Ausgangssuspension wurde eine sehr dichte Hefeaufschwemmung gewählt und 1:500, 1:750, 1:1000 und 1:1500 verdünnt. Zur Herstellung der Verdünnung 1:500 wurden in einem geeichten Meßzylinder 499 ccm NaCl-Lösung mit einem ccm der Aufschwemmung gemischt (bei den anderen Verdünnungen entsprechend 749 und 1 usw.) und so Fehler, die durch progressives Verdünnen entstehen könnten, möglichst auszuschalten. Von jeden dieser 4 Verdünnungen wurden sowohl nach Thoma-Zeiß als auch nach Bürker 15 Kammern ausgezählt, wobei vor der Beschickung jeder 5. Kammer die Verdünnungneu hergestellt wurde. Die Ergebnisse der Zählung zeigt folgende Tabelle. Die Zahlen unter A geben die in jeder Kammer gefundenen Keimzahlen auf die unverdünnte Suspension umgerechnet wieder, während unter B die arithmetischen Mittelwerte aus den jeweils bis dahin durchgezählten Kammern verzeichnet sind.

Wir sehen, daß die Zahlen unter A erheblich schwanken und zwar umso mehr, je stärker die Verdünnung ist. Das ist darauf zurückzuführen, daß in der einzelnen Kammer bei schwächerer Verdünnung mehr Keime gezählt werden als bei stärkerer. So wird z. B. bei der Verdünnung 1:1000 erst in zwei Kammern die Anzahl Keime enthalten sein, wie bei der Verdünnung 1:500

Tabelle I

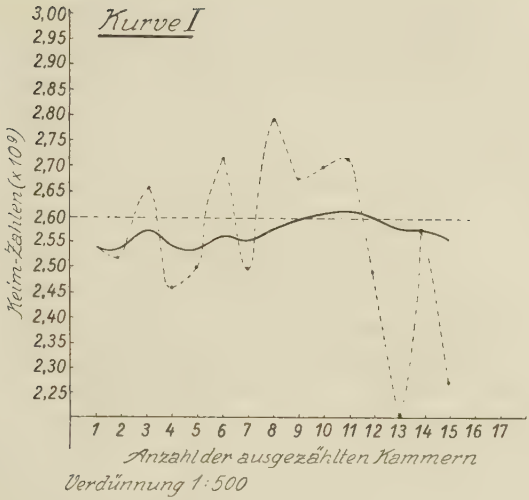
A = Keimzahlen der einzelnen Kammern (× 10^9)
B = Arithmetisches Mittel der Keimzahlen (× 10^9)

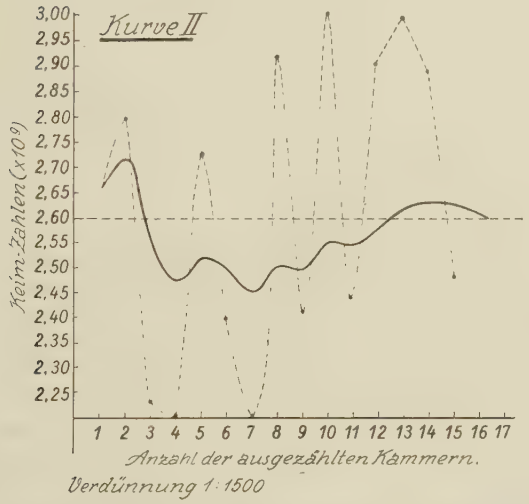
Anzahl der ausgez. Kammern	Verdünnung 1:500				Verdünnung 1:750				Verdünnung 1:1000				Verdünnung 1:1500			
	Bürker Thoma-Zeiß				Bürker Thoma-Zeiß				Bürker Thoma-Zeiß				Bürker Thoma-Zeiß			
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	2,54	2,54	2,76	2,76	2,41	2,41	2,61	2,61	2,80	2,80	2,55	2,55	2,65	2,65	2,95	2,9
2	2,52	2,53	2,42	2,59	2,33	2,37	2,63	2,62	2,94	2,87	2,87	2,71	2,79	2,72	2,29	2,6
3	2,65	2,57	2,50	2,56	2,61	2,45	2,50	2,58	2,93	2,89	2,02	2,48	2,24	2,56	2,95	2,7
4	2,45	2,54	2,48	2,54	2,65	2,50	2,42	2,54	2,57	2,81	2,28	2,43	2,20	2,47	2,65	2,7
5	2,49	2,53	2,49	2,53	2,35	2,47	2,34	2,50	2,76	2,80	2,93	2,53	2,72	2,52	2,01	2,5
6	2,71	2,56	2,59	2,54	2,65	2,50	2,80	2,55	2,32	2,72	2,29	2,49	2,40	2,50	2,33	2,5
7	2,49	2,55	2,54	2,54	2,85	2,55	2,97	2,61	2,02	2,62	1,86	2,40	2,08	2,44	2,60	2,5
8	2,79	2,58	3,02	2,60	2,47	2,54	1,97	2,53	2,86	2,65	2,40	2,40	2,92	2,50	1,82	2,4
9	2,67	2,59	2,51	2,59	2,54	2,54	2,80	2,56	2,47	2,63	3,03	2,47	2,41	2,49	2,90	2,5
10	2,69	2,60	2,49	2,58	2,94	2,58	3,16	2,62	2,33	2,60	2,97	2,52	3,09	2,55	3,10	2,5
11	2,71	2,61	2,80	2,60	2,69	2,59	2,95	2,65	2,49	2,59	2,85	2,55	2,44	2,54	3,11	2,6
12	2,49	2,60	2,72	2,61	2,71	2,60	2,65	2,65	2,23	2,56	3,51	2,63	2,90	2,57	2,73	2,6
13	2,21	2,57	2,48	2,60	2,73	2,61	2,00	2,60	2,82	2,58	1,98	2,58	3,09	2,61	3,53	2,6
14	2,57	2,57	2,18	2,57	2,33	2,59	2,74	2,61	2,86	2,60	3,14	2,62	2,89	2,63	1,99	2,6
15	2,27	2,55	2,72	2,58	2,44	2,58	2,31	2,59	2,75	2,61	2,92	2,64	2,48	2,62	2,49	2,6

schon in einer. Außerdem ist ein Größerwerden der endgültigen Durchschnittszahlen mit fortschreitender Verdünnung festzustellen wohl deswegen, weil bei schwächerer Verdünnung zahlreiche Zellen durch andere verdeckt werden und sich so der Zählung entziehen.

Schließlich erkennt man bei der Betrachtung der Zahlen unter B eine starke Abnahme der Schwankung mit jeder weiteren Zählung, obwohl die Ergebnisse der letzten Kammern dieselben Ungleichmäßigkeiten aufweisen wie bei der ersten. Diese Verhältnisse werden am besten aus folgenden Kurven deutlich.

In den Kurven sind die Zahlen der Durchschnittswerte ausgezogen und die der aus jeder Zählung resultierenden Werte gestrichelt. Man sieht, daß die ausgezogenen Linien bei der schwächeren Verdünnung von vorn herein ruhiger verlaufen und sich bald dem Durchschnittswert aus sämtlichen Zählungen nähern (2,6 mal 10^9), während bei der Verdünnung 1:1500 etwa erst von der 10. Zählung ab eine gewisse Regelmäßigkeit festzustellen ist. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Thoma-





Zeiß'schen Zählkammer. Es ist deshalb angebracht, eine nicht zu starke Verdünnung zu wählen, wenn man bei wenigen Zählungen mit einem Resultat rechnen will, das dem wahren Wert möglichst nahe kommt. Bei den in der Arbeit notwendigen Zählungen wurden deshalb jedesmal von zwei verschiedenen Verdünnungen, die diesen Forderungen entsprachen, je 10 Kammern ausgezählt und dadurch ein guter Mittelwert erzielt. Wir hätten nun also für die zu untersuchende Hefeaufschwemmung

2,6 mal 10^9 als Keimzahl für den ccm ermittelt. Da für die Berechnung des Keimgehaltes nach dem Verfahren von Schmidt die Maße eines einzelnen Hefepilzes bekannt sein müssen, wurden sie durch Messung im Mikroskop festgestellt. Zu diesem Zweck wurde ein Okularmikrometer mit Hilfe einer Quadratseite der Bürker'schen Zählkammer geeicht und in derselben Kammer bei gleicher Vergrößerung bei 100 Zellen die Länge und Breite festgestellt. Tabelle II gibt die gefundenen Größen wieder.

Tabelle II

Anzahl v. 100	Gemessene Länge in μ
4	3,32
7	4,15
9	4,98
16	5,81
19	6,64
23	7,47
10	8,30
5	9,13
4	9,96
2	10,79
1	11,62

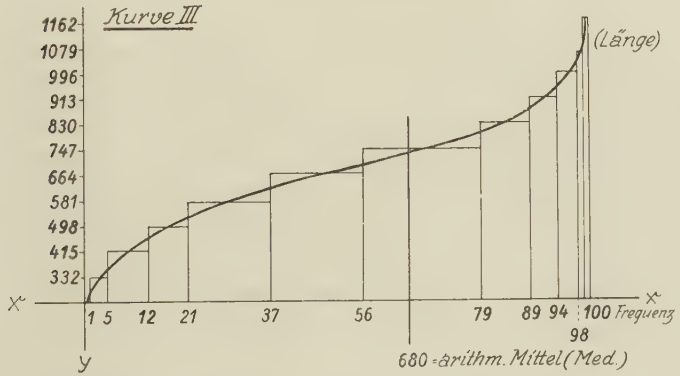
Arithm. Mittel: 6,8 μ

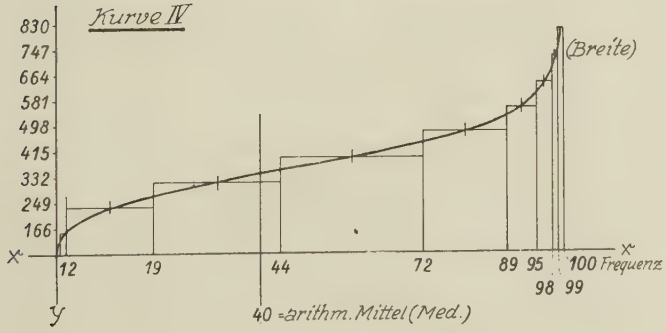
Anzahl v. 100	Gemessene Breite in μ
2	1,66
17	2,49
25	3,32
28	4,15
17	4,98
6	5,81
3	6,64
1	7,47
1	8,30

Arithm. Mittel: 4,00 μ

Das arithmetische Mittel für die Länge eines Pilzes ist also mit 6,8 μ, für die Breite mit 4,0 μ gefunden. Zur deutlicheren Demonstrierung der Variabilität der gesuchten Maße dienen die in Kurve III und IV wiedergegebenen sog. Treppenkurven und die darin eingezeichneten Ogiven. Die Höhe der Rechtecke entspricht den gefundenen Maßen, die hier mit 100 multipliziert sind, die Basis deren Frequenz. Die verschiedene Breite der Stufen entspricht der verschieden großen Frequenz in den einzelnen Klassen. Die Ogivenkurve zeigt, wieweit sich die Varianten, d. h. die gefundenen Länge- bzw. Breitenmaße der binomialen Verteilung nähern. Die Abweichungen der Varianten sind dort am geringsten, wo auch die Steigerung der Kurve gering ist. Die vorliegenden Ogivenkurven sind in ihrem mittleren Verlauf ziemlich stark abgeflacht, was beweist, daß die meisten Varianten nur wenig von dem Durchschnittsmaß Med. abweichen und daß sie auch untereinander nicht sehr verschieden sind. Die Steilheit der Kurve zu Anfang und Ende zeigt,

daß nur wenige Varianten im negativen bzw. positiven Sinne große Abweichungen vom Mittel besitzen. Das arithmetische Mittel müßte die Ogive da schneiden, wo sie die obere Linie des Rechtecks der größten Frequenz kreuzt, doch nur dann, wenn es sich um eine regelmäßig binomiale Verteilung der Varianten handelte, d. h. wenn von dem wahren Mittelmaß abweichend ebensoviel größere wie kleinere Maße gefunden wären. Bei beiden Kurven trifft dies nicht zu, die arithmetische Mittellinie liegt beide Male tiefer. Trotzdem sind der Rechnung die arithmetischen Mittelmaße zu Grunde gelegt, weil anzunehmen ist, daß bei zahlreichen Messungen die ideale Ogivenkurve immer mehr erreicht wird und daß sich die Mitte der oberen Seite des Rechtecks der größten Frequenz senkt und dem arithmetischen Mittel näher kommt, denn man ist bei derartigen Messungen von verhältnismäßig wenigen Individuen leicht versucht, mehr größere als kleinere Zellen zu untersuchen.





In der Literatur konnten über die Ausmaße einer Hefezelle keine sicheren Angaben gefunden werden. Lediglich über die Dicke der Zellmembran sind von Müller im Handbuch für Hygiene genauere Angaben gemacht, wonach sie bei jungen Zellen 0,5 μ, bei älteren bis zu 0,9 μ beträgt. Die Abbildung einer mikroskopischen Photographie von Preßhefezellen nach Lindner bestätigt die von mir gefundenen Größenordnungen beim Vergleich der Membranstärke mit der Länge bzw. Dicke der ganzen Zelle.

Es soll nun also versucht werden, aus den so gefundenen Maßen für die einzelne Hefezelle den Keimgehalt der Aufschwemmung zu errechnen. Da hierzu die h und H Werte bekannt sein müssen, wurden sie zunächst als Mittel aus 10 Messungen festgestellt. Tabelle III gibt die gefundenen Größen wieder. Die in derselben Tabelle gleich mit angegebenen Keimzahlen sind mit dem aus der Berechnung weiter unten resultierenden Multiplikator 14,08 errechnet und ihre Abweichungen prozentual auf die durchschnittliche Keimzahl 2,75 mal 10^9 bezogen. Die Fehler bleiben weit unter 5 % und zeigen, mit welcher Genauigkeit das Verfahren bei Wiederholung derselben Messung arbeitet. Selbstverständlich werden die Abweichungen nicht so gering bleiben bei Messungen von Suspensionen mit niedrigerem Keimgehalt oder Impfstoffen, deren suspendierte Keime nicht so groß sind wie die Hefezellen, da die ausgeschleuderte Bakteriensäule dann entsprechend kleiner würde und ein Messungsfehler sich bei der Division von $h:H$ stärker auswirken würde, wie wir es bei den noch folgenden Tabellen erkennen können.

Mathematisch ist die Form eines Hefepilzes am besten als Rotationselipsoid zu betrachten. Der Inhalt eines Rotationselipsoids ist $\frac{4}{3}\pi a b^2$, wenn a für die halbe Längsachse und b für den halben Durchmesser gesetzt wird. Für unsere Rechnung ist demnach $a = 3{,}4\ \mu$ oder 34 mal 10^{-5} cm und $b = 2\ \mu$ oder 20 mal 10^{-5} cm. Von diesen Rotationselipsoiden gehen bei völliger Deformierbarkeit der Zellen in den Zylinderraum $\pi r^2 h$ (die abgesetzte Bakteriensäule) $\frac{3\pi r^2 h}{4\pi a b^2}$ hinein. Wenn wir

Tabelle III

	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahlen ($\times 10^9$)	Abweichung v. d. mittl. Keimzahl $2{,}78 \times 10^9$ in %
1)	1,31	6,50	0,2015	2,83	+1,7
2)	1,42	7,20	0,1972	2,77	−0,3
3)	1,36	6,80	0,2000	2,81	+1,0
4)	1,43	7,33	0,1950	2,74	−1,4
5)	1,42	7,37	0,1939	2,79	+0,3
6)	1,38	7,12	0,1940	2,73	−1,7
7)	1,32	7,65	0,1985	2,79	+0,3
8)	1,39	7,00	0,1996	2,81	+1,0
9)	1,40	7,10	0,1972	2,77	−0,3
10)	1,37	6,91	0,1993	2,81	+1,0
			Mittel: 0,1976	Mittel: 2,78	

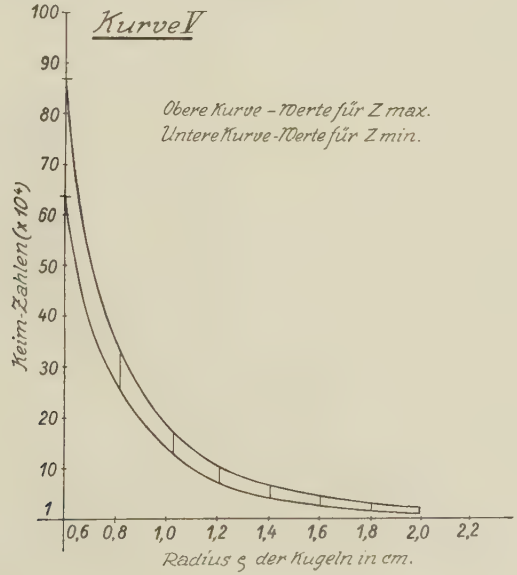
diese Zahl, die das Maximum darstellt, als z bezeichnen, so hätten wir also z max. $= \frac{3r^2h}{4ab^2}$ und für die Zahl x (Keimgehalt in ccm) $\frac{3r^2h}{4ab^2 \cdot \pi r^2 H}$ oder x max. $= \frac{h}{H} \cdot \frac{3}{4\pi ab^2} = \frac{h}{H} \cdot 17{,}56 \cdot 10^9$ $= 3{,}47 \cdot 10^9$. Die Berechnung der Keimzahl bei unveränderter Form der Zellen, aber engster Packung gestaltet sich in sofern schwieriger, als die Lagerung der Pilze unter diesen Voraussetzungen mathematisch nicht so genau zu erfassen ist wie bei Kugeln. Es mußten daher einige Annahmen gemacht werden, die den tatsächlichen Verhältnissen wohl nicht ganz entsprechen, durch die aber die Berechnung möglich wird. Um die Zwischenräume, die bei engster Packung und starrer Form entstehen, mit in die Rechnung hineinzubekommen, wurde angenommen, daß die Pilze von einem Zylindermantel umgeben sind und in den Zylinderraum $\pi r^2 h$ so hineingeschichtet sind, wie etwa Zigaretten in einen zylindrischen Behälter. Diese Zylinder, von denen jeder in derselben Ebene 6 andere berührt, denkt man sich wieder von regulären sechskantigen Prismen umgeben, deren Flächen einander decken, sodaß auf diese Weise der Raum restlos ausgefüllt ist, bis auf die Lücken, die am Zylindermantel entstehen, die aber vernachlässigt werden können, da ihre Größe im Verhältnis zu dem Volumen des Zylinders verschwindend klein ist. Der Inhalt eines solchen regel-

mäßigen sechskantigen Prismas wird durch den Radius des eingeschriebenen Zylinders ausgedrückt, dessen Länge und Breite wieder den Maßen des eingeschriebenen Rotationselipsoids entsprechen, und ist $2b^2 \cdot 2a\sqrt{2}$. Von solchen Körpern gehen in den Cylinderraum $\frac{\pi r^2 h}{2b^2 \cdot 2a\sqrt{3}}$ hinein, wir haben also für das Minimum z min. $= \frac{\pi r^2 h}{4ab^2\sqrt{3}}$ und für die Zahl x (das Minimum der in einem ccm enthaltenen Pilze) x min. $= \frac{\pi r^2 h}{4ab^2\sqrt{3} \cdot \pi r^2 H}$ $= \frac{h}{H} \cdot \frac{1}{4ab^2\sqrt{3}} = \frac{h}{H} \cdot 10{,}61 \cdot 10^9 = 2{,}09 \cdot 10^9$ gefunden. In Wirklickkeit wird dieser Wert etwas kleiner sein, da die Zellen wahrscheinlich von einer dünnen Wasserhülle umgeben sind, die trotz schärfsten Zentrifugierens haften bleibt. Immerhin kann man aber erwarten, daß die wirkliche Keimzahl innerhalb dieser beiden Grenzwerte liegt, da eine gewisse Deformierung gerade bei den Hefezellen mit Sicherheit anzunehmen ist, wenn man die Dicke ihrer Zellmembran im Vergleich zu der Größe der ganzen Zelle und die wabige Struktur des Zellplasmas bedenkt, und zwar müßte sie theoretisch näher an x min. liegen. Tatsächlich liegt der durch Zählung gefundene Wert zwischen beiden errechneten Keimzahlen und auch näher an x min., was damit zu begründen ist, daß die Maße einer Zelle etwas zu klein genommen sind. Setzt man für $\frac{x \text{ max.} + x \text{ min.}}{2}$ den aus der Zählung gefundenen Wert ein, für $\frac{h}{H}$ den Mittelwert und für die Länge des Keimes $2a = 7{,}8\ \mu$, so kann man aus der Gleichung $\frac{x \text{ max.} + x \text{ min.}}{1} = \left(\frac{h}{H} \cdot \frac{3}{4\pi ab^2} + \frac{h}{H} \cdot \frac{1}{4ab^2\sqrt{3}}\right) : 2$ die Größe des Durchmessers $2b$ errechnen, die dem richtigen Wert am besten entspräche. Sie wird durch folgenden Ausdruck gefunden: $2b = 2 \cdot \sqrt{\frac{h}{H} \cdot \frac{3\sqrt{3} + \pi}{8 \cdot \pi \cdot a \cdot \sqrt{3} \cdot z}}$, wenn $z = \frac{x \text{ max.} + x \text{ min.}}{2}$ ist. Die Rechnung ergibt für $2b$ 41,38 mal 10^{-5} cm, also tatsächlich etwas mehr, als durch die Messung gefunden wurde.

Als Keimzahlwert der Suspension wird das arithmetische Mittel von x max. und x min. genommen, d. h. das arithmetische Mittel der Multiplikatoren von x max. (17,56) und x min. (10,61) 14,08 wird mit dem aus 10 Messungen als Mittelwert gefundenen $\frac{h}{H}$ Wert multipliziert und ergibt so die gesuchte Keimzahl. Inwieweit man dazu berechtigt ist, soll folgende Untersuchung zeigen. Man denkt sich einen Zylinder mit der Höhe $h = 100$ cm und dem Radius $r = 50$ cm. Dieser Zylinder wird nun mit gleich großen Kugeln angefüllt, die einmal als starr und einmal als maximal deformierbar gedacht werden. Tabelle IV zeigt das

Tabelle IV

Größe der Kugeln in cm	z min	z max	Differenz		Abweichung des z min-Wertes von z max in %
0,1	$13{,}87 \cdot 10^7$	$18{,}75 \cdot 10^7$	$4{,}88 \cdot 10^7$	2,6	
0,2	$17{,}34 \cdot 10^6$	$23{,}43 \cdot 10^6$	$6{,}09 \cdot 10^6$	2,6	
0,4	$21{,}68 \cdot 10^5$	$29{,}29 \cdot 10^5$	$7{,}61 \cdot 10^5$	2,6	
0,6	$64{,}24 \cdot 10^4$	$86{,}80 \cdot 10^4$	$22{,}56 \cdot 10^4$	2,6	
0,8	$26{,}40 \cdot 10^4$	$36{,}62 \cdot 10^4$	$10{,}22 \cdot 10^4$	2,6	
1,0	$13{,}87 \cdot 10^4$	$18{,}75 \cdot 10^4$	$4{,}88 \cdot 10^4$	2,6	
1,2	$80{,}30 \cdot 10^3$	$10{,}85 \cdot 10^4$	$28{,}20 \cdot 10^3$	2,6	
1,4	$50{,}57 \cdot 10^3$	$68{,}33 \cdot 10^3$	$17{,}76 \cdot 10^3$	2,6	
1,6	$33{,}88 \cdot 10^3$	$45{,}77 \cdot 10^3$	$11{,}89 \cdot 10^3$	2,6	
1,8	$23{,}79 \cdot 10^3$	$32{,}15 \cdot 10^3$	$8{,}36 \cdot 10^3$	2,6	
2	$17{,}34 \cdot 10^3$	$23{,}39 \cdot 10^3$	$6{,}05 \cdot 10^3$	2,6	
3	$51{,}39 \cdot 10^2$	$69{,}44 \cdot 10^2$	$18{,}05 \cdot 10^2$	2,6	
4	$21{,}68 \cdot 10^2$	$29{,}29 \cdot 10^2$	$7{,}61 \cdot 10^2$	2,6	
5	$11{,}10 \cdot 10^2$	$15{,}00 \cdot 10^2$	$3{,}90 \cdot 10^2$	2,6	
6	$64{,}24 \cdot 10$	$86{,}80 \cdot 10$	$22{,}56 \cdot 10$	2,6	
7	$40{,}45 \cdot 10$	$54{,}66 \cdot 10$	$14{,}21 \cdot 10$	2,6	
8	$27{,}10 \cdot 10$	$36{,}62 \cdot 10$	$9{,}52 \cdot 10$	2,6	
9	$19{,}03 \cdot 10$	$25{,}72 \cdot 10$	$6{,}69 \cdot 10$	2,6	
10	$13{,}87 \cdot 10$	$18{,}75 \cdot 10$	$4{,}88 \cdot 10$	2,6	



Protokoll der Berechnung von x min. und x max. bei verschiedenen Größen des Radius.

Man sieht, daß die Differenzen von z min. und z max. mit dem Kleinerwerden des Radius wachsen, daß sie auf z max. bezogen aber immer im selben Verhältnis bleiben. In Kurve 5 ist ein Teil der Tabelle graphisch dargestellt und erläutert das Gesagte.

Die Werte für z max. und z min. nehmen im Bereich der kleineren Radien erheblich stärker ab als bei den größeren. Für die Berechnung der Keimzahlen erhellt daraus die Notwendigkeit, für die Keime jeweils möglichst genaue Maße einzusetzen.

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Methode wurden nun noch fortschreitende Verdünnungen aus der Stammsuspension hergestellt und nach dem beschriebenen Verfahren gemessen. Tabelle V zeigt die für h und H gefundenen Werte, sowie die aus ihnen mit Hilfe des Multiplikators 14,08 errechneten Keimzahlen, deren Abweichungen von den entsprechenden durch Zählung gefundenen Keimzahlwerten in allen Fällen unter 10% bleiben. Bisher ist also die durch Zählung bekannte Keimzahl durch das Zentrifugierverfahren mit Abweichungen von stets weniger als 10% wiedergefunden worden.

Tabelle V

Verdünnung	Ergebnis aus 2 Messungen für h (in cm) u. H (in cm)		$\frac{h}{H}$	$\frac{h}{H}$	Mittelwert für $\frac{h}{H}$	Keimzahlen d. gem. Verdünnungen ($\times 10^9$)	Keimzahlen aus d. Verdünnungen der gez. Keimzahl ($\times 10^9$)	Abweichung der gemessenen von d. gez. Keimzahl in %
1 : 2	1) 0,68 2) 0,68	1) 7,12 2) 7,00	0,0955	0,0971	0,0963	1,36	1,30	+4,6
1 : 4	1) 0,37 2) 0,36	1) 7,21 2) 7,26	0,0510	0,0496	0,0503	0,70	0,65	+7,6
1 : 6	1) 0,24 2) 0,23	1) 7,41 2) 7,01	0,0324	0,0332	0,0328	0,46	0,43	+6,9
1 : 8	1) 0,17 2) 0,18	1) 7,10 2) 7,07	0,0242	0,0254	0,0248	0,35	0,32	+9,3
1 : 10	1) 0,14 2) 0,14	1) 7,21 2) 7,25	0,0197	0,0199	0,0198	0,27	0,26	+3,8

Es folgt nun die Berechnung von Bakteriensuspensionen, die als Impfstoffe am häufigsten Verwendung finden, und zwar zunächst die Keimbestimmung einer Suspension des Staphylococcus aureus in physiol. Kochsalzlösung mit einem Zusatz von 0,5 % Carbol. Schmidt hat in seiner Arbeit die Berechnung bereits durchgeführt. Sie soll deshalb hier nur kurz angedeutet werden. Da aber von Schmidt als Vergleichszählung die Methode nach Wright benutzt wurde, scheinen die von mir gefundenen Werte doch wichtig zu sein, weil sie mit den Resultaten der ungleich genaueren Zählung in der Zählkammer verglichen werden konnten. Die Suspension wurde in zwei Verdünnungen (1 : 10.000 und 1 : 20.000) in der Zählkammer im Dunkelfeld gezählt. Von jeder Verdünnung wurden 10 Kammern voll ausgezählt, und damit, wie weiter oben begründet ist, eine genügende Genauigkeit erreicht, wie sie zur Standardisierung einer neuen Keimzählungsmethode erforderlich ist.

Die Zählung geschah in der Bürker'schen Zählkammer, die eine Tiefe von 0,02 mm hat, sodaß man nur wenige Minuten warten muß, bis die Keime sich auf dem Boden der Kammer abgesetzt haben. Als optischer Apparat wurde ein Präparierwechselkondensor benutzt, wie er von T. Péterfi angegeben und von L. Wamoscher beschrieben wurde. (Hergestellt von der Firma C. Zeiß, Jena.) Der P.-W.-Kondensor hatte eine numerische Apertur von 0,7 — 0.8 und eine Schnittweite von 4,5 mm. Der Beleuchtungsapparat wird so eingestellt, daß der Brennpunkt des Kondensors am Deckglas als scharf begrenzter heller Punkt erscheint. Mit einem Achromat-Objektiv von 20facher Einzelvergrößerung und einer numerischen Apertur von 0,40 sind die Bakterien schon bei 400facher Vergrösserung so deutlich zu erkennen, daß Verwechslungen mit aufleuchtenden Staubpartikelchen auch bei geringerer Übung leicht zu vermeiden sind. Das Protokoll der Zählung ist wie folgt:

Tabelle VI

	Anzahl der ausgezählten Kammern.										
Verdünnung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mittel
1 : 10000	55,4	64,6	59,4	62,8	60,6	53,0	57,0	62,8	60,6	53,4	58,9 ($\times 10^9$)
1 : 20000	61,6	64,0	66,6	60,0	58,4	78,8	65,2	57,6	62,0	62,8	63,7 ($\times 10^9$)

Arithmetisches Mittel aus den Zählungen beider Verdünnungen: $61{,}3 \cdot 10^9$)

Die Durchschnittszahlen der schwächeren Verdünnungen sind hier ebenfalls wieder größer als die der stärkeren. Ähnlich würden sich die Tabellen über die Zählungsresultate aller anderen im folgenden behandelten Bakterienarten gestalten. Nun wurden mit dem beschriebenen Verfahren 10 mal die h und H Werte der unverdünnten Suspension gemessen, um möglichst genaue Durchschnittszahlen zu erhalten. Die Maße waren im einzelnen folgende:

Tabelle VII

	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahl ($\times 10^9$)	Abweichung v. d. durchschnittl. Keimzahl 61,3 $\times 10^9$ in %
1)	0,15	8,27	0,0181	62,68	+2,2
2)	0,13	7,55	0,0172	59,56	—2,8
3)	0,15	8,45	0,0177	61,29	—0,1
4)	0,15	8,30	0,0180	62,33	+1,0
5)	0,14	7,82	0,0179	61,96	+1,1
6)	0,14	7,97	0,0175	60,06	—2,0
7)	0,13	7,61	0,0170	58,87	—3,9
8)	0,15	8,15	0,0184	63,71	+3,9
9)	0,15	8,26	0,0181	62,68	+2,2
10)	0,14	7,83	0,0178	61,54	+0.3
			Mittel: 0,0177	Mittel: 61,3	

Die Keimzahlen wurden mit Hilfe des Multiplikators 3463,3 errechnet, der aus der im folgenden gefundenen Formel $M = \frac{Z}{\frac{h}{H}}$ resultiert. Zur Bestimmung der Keimzahl aus den Größen für h und H und dem Volumen eines einzelnen Staphylococcus wurde der von Schmidt gefundene Radius von 0,4 μ als Maß angenommen, wie er auch in der Literatur als Durchschnittsgröße angegeben ist. Die Berechnung geht in der schon oben beschriebenen Weise vor sich. Sie ergibt für die Maximalzahl x max. $= \frac{h}{H} \cdot \frac{3}{4\pi\varrho^3} = \frac{h}{H} \cdot 3732 \cdot 10^9 = 66{,}06 \cdot 10^9$ und für die Minimalzahl x min. $= \frac{h}{H} \cdot \frac{1}{4\varrho^3\sqrt{2}} = \frac{h}{H} \cdot 2762 \cdot 10^9 = 48{,}89 \cdot 10^9$. Die Zählung in der Zählkammer ergab $61.3 \cdot 10^9$ Keime pro ccm, ein Wert, der nur um $3{,}83 \cdot 10^9$ größer ist als der Durch-

schnittswert von x min. und x max. ($57{,}47 \cdot 10^9$). Aus folgender Gleichung: $\frac{h}{H} \cdot \frac{3}{8\,\pi\,\varrho^3} \cdot \frac{h}{H} \cdot \frac{1}{8\,\varrho^3\sqrt{2}} = \frac{x\,\text{max.} + x\,\text{min.}}{2}$ läßt sich der genauere Multiplikator errechnen, wenn man für $\frac{x\ \text{max.}\ x\ \text{min.}}{2}$ ($= z$) $61{,}3 \cdot 10^9$, also die gezählte Keimzahl, und für $\frac{3\sqrt{2} + \pi}{8\,\pi\,\varrho^3\sqrt{2}}$ M einsetzt. Der Wert für M resultiert dann aus der Gleichung $M = \frac{z}{h : H}$ und ist 3463,3. Die so gefundene Zahl wurde auch bei der Berechnung der Keimzahlenwerte der Verdünnungen benutzt mit den Ergebnissen der Tabelle VIII:

Tabelle VIII

Verdünnung	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahlen aus d. Verd. ($\times 10^9$)	Keimzahlen aus d. Verdünnungen d. gez. Keimzahl ($\times 10^9$)	Abweichung d. gem. von der gez. Keimzahl in %
1 : 1,2	0,115	7,71	0,0149	51,59	51,08	+1
1 : 1,5	0,09	7,85	0,0114	39,47	40,66	−3,9
1 : 1,8	0,07	7,21	0,0097	33,59	34,05	−1,0
1 : 2,0	0,06	7,51	0,0093	32,19	30,70	+4,8
1 : 2,5	0,055	7,67	0,0071	24,59	24,58	+0,2

Die Fehlerbreite bleibt unter 10%, obwohl die Messungen nur mit Hilfe eines Präzisionsmaßstabes gemacht wurden.

Zur Messung der Keimzahl einer Streptokokken-Suspension, deren Dichte durch Zählung in Verdünnungen von 1 : 10.000 und 1 : 20.000 mit $34{,}35 \cdot 10^9$ gefunden wurde, benutzte ich dieselbe Größe für den Radius wie bei den Staphylokokken, also 0,4 μ oder $4{,}0 \cdot 10^{-5}$ cm. Der $h : H$ Wert der unverdünnten Suspension wurde auch wieder durch 10 Messungen festgestellt (Tab. IX).

Die Keimzahlen sind mit dem Multiplikator 2911 aus der Formel $M = \frac{Z}{\frac{h}{H}}$ (s. u.) ermittelt. Die Rechnung konnte genau so durchgeführt werden wie bei der Bestimmung der Staphylokokken-Suspension und ergab x max. $= \frac{h}{H} \cdot 3732 \cdot \cdot 10^9 =$

Tabelle IX

	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahlen ($\times 10^9$)	Abweichung v. d. mittl. Keimzahl 34,30 $\times 10^9$ in %
1)	0,10	8,25	0,0121	36,2	+5,5
2)	0,09	7,85	0,0114	33,1	−3,4
3)	0,10	8,00	0,0125	36,4	+6,1
4)	0,09	7,75	0,0116	33,7	−1,7
5)	0,09	7,70	0,0117	34,0	−0,8
6)	0,08	7,00	0,0114	33,1	−3,4
7)	0,10	8,13	0,0123	35,5	+3,4
8)	0,10	8,30	0,0120	34,9	+1,7
9)	0,08	6,90	0,0115	33,4	−2,6
10)	0,09	7,60	0,0118	34,3	±0
			Mittel: 0,0118	Mittel: 34,3	

$44{,}04 \cdot 10^9$ und x min. $= \frac{h}{H} \cdot 2762 \cdot 10^9 = 32{,}59 \cdot 10^9$. Der Mittelwert für den Multiplikator ist demnach 3247 und die mittlere Keimzahl $38{,}32 \cdot 10^9$, also etwas weniger, woraus zu schließen ist, daß ein Streptococus etwas größer ist als ein Staphylococcus und deshalb der Multiplikator kleiner zn nehmen ist, als er durch die Rechnung gefunden wurde. Aus der Gleichung $M = \frac{z}{h : H}$, deren Zustandekommen oben beschrieben ist, resultiert für M der Wert 2911, der als genauer anzusehen ist und folgenden Keimzahlwerten zugrunde liegt.

Tabelle X

Verdünnung	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahl. aus der Verd. ($\times 10^9$)	Keimzahl. aus den Verd. d. gez. Keimzahl ($\times 10^9$)	Abw. d. gem. von der gez. Keimzahl in %
1 : 1,1	0,085	7,51	0,0111	32,8	31,2	+5,1
1 : 1,3	0,065	7,63	0,0085	24,7	26,4	−6,4
1 : 1,6	0,055	7,81	0,0070	20,3	21,0	−3,3
1 : 1,9	0,045	7,70	0,0058	16,8	18,0	−6,6
1 : 2,2	0,04	7,37	0,0054	15,7	15,5	+1,2

Aus der Reihe der Diplokokkenarten wurden Gonokokken-, Meningokokken- und Pneumokokken-Suspensionen gewählt. Bei der Zählung dieser Bakterien in der Zählkammer erhebt sich die Frage, ob ein Diplococcus als ein oder zwei Individuen anzusehen ist. Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen fand sich selten ein Coccus einzeln, vielmehr imponierten die Keime größtenteils in Diploform, nicht selten auch in Tetraden. Die Tetraden waren leicht als solche zu erkennen und konnten bei der Zählung berücksichtigt werden, nicht aber die Diploformen, besonders die der Gono- und Meningokokken. Hier war die Zusammensetzung eines Keimgebildes aus zwei Kokken nur dann mit Sicherheit festzustellen, wenn es gerade in einer günstigen Beleuchtungsebene lag. Die Diplokokken wurden deshalb als ein Individuum gezählt und auch so berechnet. Danach würden die aus Zählung und Rechnung resultierenden Keimzahlen doppelt zu nehmen sein, will man einen Diplococcus als zwei Einzelindividuen auffassen. Da die Diplokokken sich durch Teilung vermehren, kann die Doppelform als Teilungsstadium und mit Recht als ein Individuum angesehen werden. Nach vollendeter Teilung scheint der isolierte Coccus sofort wieder seinerseits einen Diplococcus zu bilden, wodurch das seltene Auftreten von Einzelindividuen erklärt würde. Kolle und Hetsch beschreiben in ihrem Handbuch für experimentelle Bakteriologie und Infektionskrankheiten den Teilungsvorgang der Gonokokken so, daß sich die Einzelkokken in Richtung einer auf der Längsachse des ursprünglichen Kokkenpaares senkrecht stehenden Achse einschnüren, wodurch der Spalt zwischen den Einzelkokken mehr oval wird. und daß die Kokken kurz nach der Teilung in 4 Einzelexemplaren zusammenliegen. Nach dieser Darstellung würde die Tetraform als Teilungsstadium von zwei Einzelkokken anzusehen sein, also zwei Diplokokken repräsentieren. Entsprechend der Ungewißheit, die über die Frage herrscht, ob ein Einzelcoccus oder ein Diplococcus als ein oder zwei Individuen anzusehen ist, sind auch die Angaben über die Ausmaße der Diplokokken verschieden. Meistens wird eine Zahl für die Länge eines Paares nnd eine für den größten Durchmesser angegeben. So in dem erwähnten Handbuch von Kolle und Hetsch, ebenso von Neisser und

H. A. Gins oder von Lehmann und Neumann. Die von S. Muntner bei seinen Größenberechnungen für Bakterien mit Hilfe des Kleinmann'schen Nephelometers und einer Standardformel für die Diplokokkenarten gefundenen Maße beziehen sich dagegen nur auf einen Einzelcoccus.

Es sollen nun die Zählungen und Berechnungen der drei genannten Diplokokkenarten im einzelnen besprochen werden. Die Zählung der Gonokokken-Suspension ergab bei zwei verschiedenen Verdünnungen und je 10 ausgezählten Kammern die mittlere Keimzahl $38{,}7 \cdot 10^9$ Gono-Diplokokken im ccm. Der Durchschnittswert für $h : H$ der unverdünnten Suspension, gemessen an 10 Kapillaren war 0,0240. Tabelle XI zeigt die bei den 10 Messungen gefundenen Werte. Die Keimzahlen, die sich aus den einzelnen Größen für $\frac{h}{H}$ ergeben, wurden mit mit dem aus der folgenden Berechnung resultierenden Multiplikator 1703 gefunden und ihre Abweichung von der Durchschnittskeimzahl prozentual errechnet. Die Fehlerbreite übersteigt wieder nicht die von Schmidt angegebene Grenze von 10%.

Tabelle XI

	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahl ($\times 10^9$)	Abweichung in % von d. mittl. Keimzahl 40,87 $\times 10^9$
1)	0,18	7,56	0,0238	40,53	—0,8
2)	0,19	7,80	0,0243	41,38	+1,2
3)	0,18	7,50	0,0240	40,87	± 0
4)	0,18	7,65	0,0235	40,02	+2,8
5)	0,18	7,23	0,0244	41,55	+1,6
6)	0,17	7,23	0,0235	40,02	—2,8
7)	0,19	7,90	0,0240	40,87	± 0
8)	0,18	7,43	0,0242	41,21	+0,8
9)	0,20	8,31	0,0240	40,87	± 0
10)	0,19	7,69	0,0247	42,06	+2,9
			Mittel: 0,0240	Mittel: 40,87	

Zur Berechnung der Keimzahl aus diesen Werten und der Größe eines Diplococcus wurde dieser als ein Körper betrachtet, der aus zwei sich in den Längsseiten berührenden Rotations-

elipsoiden zusammengesetzt ist. Dieser mathematische Körper wurde gewählt, weil er vielleicht der Semmelform der Gonokokken am besten entspricht. Für die Längsachse und den Durchmesser eines Diplococcus wurden die in der Literatur durchschnittlich als Mittelmaße angegebenen Größen von 1,5 bzw. 0,8 μ angenommen. Die Längsachse jedes der beiden Rotationselipsoide ist demnach gleich dem Durchmesser des Diplococcus, also $2a = 0.8\ \mu$ oder $= 8 \cdot 10^{-5}$ cm und $a = 4 \cdot 10^{-5}$ cm, der Durchmesser eines Rotationselipsoids gleich der Hälfte der Längsachse eines Diplococcus, also $2b = 0{,}75$ oder $7{,}5 \cdot 10^{-5}$ cm und $b = 3{,}75 \cdot 10^{-5}$ cm. Der Rauminhalt eines Diplococcus ist doppelt so groß wie der Inhalt eines der beiden Rotationselipsoide und wird durch die Formel $2 \cdot \frac{4}{3} \pi a b^2 = \frac{8}{3} \pi a b^2$ ausgedrückt. Z max. ist demnach $\frac{3 r^2 h}{8 a b^2}$ und x max. $\frac{3 r^2 h}{8 a b^2 \cdot \pi r^2 H} = \frac{h}{H} \cdot 2123 \cdot 10^9 = 50{,}95 \cdot 10^9$.

Zur Berechnung des x min. Wertes stellt man sich ähnlich wie es bei den Hefezellen beschrieben wurde, vor, daß jedes der beiden Rotationselipsoide von einem regulären sechskantigen Prisma umgeben ist, dessen Rauminhalt durch die halbe Längsachse (a) und den halben Durchmesser (b) des eingeschriebenen Rotationselipsoides, ausgedrückt mit der Formel $4 a b^2 \sqrt{3}$ zu berechnen ist. Der Inhalt zweier sechskantiger Prismen wäre also $8 a b^2 \sqrt{3}$ und stellt die Form und Größe eines der Diplokokken dar, die — ebenso in die Kapillare hineingeschichtet wie die Hefepilze — den Raum lückenlos ausfüllen werden und so die Berechnung der Keimdichte bei nicht deformierbarer Gestalt der Gonokokken gestatten. Z min., die Zahl der nicht deformierten Keime in der ausgeschleuderten Bakteriensäule, ist demnach gleich dem Quotienten aus $\pi r^2 h$ (Inhalt der Bakteriensäule) und $8 a b^2 \sqrt{3}$. Die Keimzahl für den ccm der Suspension ergibt sich aus der Formel $\frac{\pi r^2 h}{8 a b^2 \sqrt{3} \cdot \pi r^2 H} = \frac{h}{H} \cdot \frac{1}{8 a b^2 \sqrt{3}} = \frac{h}{H} \cdot 1283 \cdot 10^9$. Die hieraus gefundene Zahl ist $30{,}79 \cdot 10^9$, und gibt die unterste Grenze der Keimdichte

(x min.) an, im Gegensatz zu der größtmöglichen Dichte (x max.). Der Multiplikator der x min.-Berechnung ist 1283, der der x max.-Berechnung 2123, das arithmetische Mittel aus beiden Multiplikatoren 1703 und die daraus berechnete Keimdichte $40{,}87 \cdot 10^9$, ein Wert, der dem durch Zählung gefundenen nahe kommt.

Tabelle XII gibt die Messungen aus abgestuften Verdünnungen der Stammsuspension wieder. Die Keimzahlen wurden mit dem errechneten Multiplikator 1703 festgestellt. Die Fehlergrenze bleibt stets unter 10% und beweist wieder die gute Reproduzierbarkeit des Verfahrens.

Tabelle XII

Verdünnung	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahl. aus der Verd. ($\times 10^9$)	Keimzahl. aus der Verd. d. gez. Keimzahl ($\times 10^9$)	Abw. d. gem. von der gez. Keimzahl in %
1 : 1,2	0,15	7,28	0,0206	35,0	32,3	+8,3
1 : 1,4	0,125	7,17	0,0174	29,5	27,7	+6,4
1 : 1,8	0,09	7,05	0,0127	21,6	21,5	+0,4
1 : 2,6	0,08	7,80	0,0090	15,3	14,8	+3,3
1 : 3,2	0,055	7,65	0,0072	12,3	12,0	+2,4
1 : 4	0,045	7,40	0,0060	10,2	9,7	+5,1
1 : 5	0,035	7,33	0,0047	8,0	7,7	+3,9

Die Berechnung der Meningokokken- und Pneumokokken-Suspensionen wurde unter derselben Annahme bezgl. der mathematisch zu erfassenden Form eines Diplococcus durchgeführt. Der aus der Zählkammer ermittelte Keimzahlwert des Impfstoffes betrug $63{,}8 \cdot 10^9$ pro ccm, der $\frac{h}{H}$ Wert der unverdünnten Suspension, festgestellt aus 10 verschiedenen Messungen, 0,0399 (Tab. XIII).

Der Meningococcus hat im allgemeinen eine dem Gonococcus sehr ähnliche Form, seine Größe kann jedoch erheblich, je nach dem Alter der Suspension und dem zur Züchtung gebrauchten Nährboden schwanken. Zur Berechnung wurden für ihn dieselben Maße eingesetzt wie für den Gonococcus, nämlich 1,5 μ für die Länge und 0,8 μ für die Breite. Der Gang

Tabelle XIII Meningokokken

	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahlen ($\times 10^9$)	Abweichung in % von d. mittl. Keimzahl 63,80 $\times 10^9$
1)	0,30	7,70	0,0389	62,20	−2,5
2)	0,26	6,20	0,0419	66,99	+5,0
3)	0,30	7,71	0,0389	62,20	−2,5
4)	0,30	7,69	0,0390	62,36	−2,2
5)	0,28	6,54	0,0428	68,43	+7,2
6)	0,31	8,04	0,0385	61,56	−3,0
7)	0,30	7,65	0,0392	62,68	−1,7
8)	0,29	7,00	0,0414	66,18	+3,7
9)	0,31	8,08	0,0384	61,40	−3,7
10)	0,30	7,39	0,0406	64,91	+1,7
			Mittel: 0,0399	Mittel: 63,80	

der Rechnung ist derselbe wie bei der Berechnung von x max. und x min. der Gonokokken-Suspension und ist dort erläutert worden. Das Resultat war x max. $= 84{,}7 \cdot 10^9$ und x min. $= 51.19 \cdot 10^9$, das arithmetische Mittel aus beiden Multiplikatoren 1703 wie bei der Gonokokken-Suspension. Die daraus errechnete Keimdichte $67{,}94 \cdot 10^9$, eine Zahl, die von der nach Bürker gefundenen etwas abweicht, was wohl auf die ungenügende Genauigkeit der angenommenen Maße einer einzelnen Zelle zurückzuführen ist, denn der Meningococcus ist oft etwas größer als der Gonococcus und wahrscheinlich auch bei der untersuchten Suspension, da der Multiplikator aus der Formel $M = \frac{z}{h : H}$ berechnet 1599 ergab, also kleiner war, als der auf Grund der Keimgröße gefundene.

Wichtig ist ja bei diesen Berechnungen vor allem die Feststellung eines Multiplikators, mit dessen Hilfe der Keimgehalt einer Suspension zu bestimmen ist. Die Durchführung der Rechnung ist natürlich in der Praxis in jedem einzelnen Falle nicht möglich, sie soll hier nur zeigen, daß es durchaus angängig ist, von der Größe der einzelnen Zelle ausgehend den Keimgehalt der ausgeschleuderten Bakteriensäule, wenn manchmal auch nur annähernd, festzustellen.

Tabellen XIV

	Verdünnung	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahl aus der Verd. ($\times 10^9$)	Keimzahl aus der Verd. d. gez. Keimzahl ($\times 10^9$)	Abweichung d. gem. von der gez. Keimzahl in %
1)	1 : 1,3	0,235	7,70	0,0305	48,76	49,07	— 0,6
2)	1 : 1,7	0,16	7,47	0,0214	34,21	37,53	- 8,8
3)	1 : 2,1	0,14	7,48	0,0187	29,90	30,38	1,5
4)	1 : 2,5	0,12	7,49	0,0160	25,58	25,52	+ 0,2
5)	1 : 3	0,095	7,24	0,0131	20,94	21,26	— 1,5
6)	1 : 4	0,075	7,55	0,0099	15,83	15,95	— 0,7
7)	1 : 6	0,05	7,78	0,0064	10,23	10,63	— 3,7

Von der Meningokokken-Stamm-Suspension wurden ebenfalls fortschreitende Verdünnungen hergestellt, ihre Keimdichte mit dem Multiplikator 1599 errechnet und Abweichungen von den entsprechenden Keimzahlen aus dem gezählten Wert ermittelt (Tab. XIV).

Die Keimdichte der untersuchten Pneumokokken-Suspension, gezählt an zwei verschiedenen Verdünnungen in der Bürker'schen Kammer betrug $17{,}5 \cdot 10^9$ pro ccm. Der $\frac{h}{H}$ Wert der unverdünnten Aufschwemmung wurde ebenfalls wieder durch 10 Messungen nach dem beschriebenen Verfahren bestimmt und war 0,012, wie aus Tabelle XV hervorgeht.

Tabelle XV

	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahlen ($\times 10^9$)	Abweichung in % von der mittl. Keimzahl $17{,}50 \times 10^9$
1)	0,11	8,07	0,0136	18,44	+ 5,3
2)	0,10	7,90	0,0126	17,09	— 2,3
3)	0,10	7,78	0,0128	17,36	— 0,8
4)	0,09	7,43	0,0126	17,09	— 2,3
5)	0,11	7,21	0,0133	18,04	+ 3,0
6)	0,10	7,82	0,0127	17,22	— 1,6
7)	0,10	7,71	0,0129	17,50	± 0
8)	0,11	8,13	0,0135	18,31	+ 4,6
9)	0,10	7,92	0,0126	17,09	— 2,3
10)	0,10	7,67	0,0130	17,63	+ 0,7
		Mittel:	00,119	Mittel: 17,50	

Über die Größe des Pneumococcus konnten keine genauen Angaben gefunden werden, es war lediglich die Gestalt des Bakteriums eingehender beschrieben, das einen Diplococcus darstellt, dessen Einzelkokken längliche, ungefähr kerzenflammenartige Form haben und deren Spitzen die Pole des Diplococcus bilden, während die breiteren Grundflächen einander zugekehrt sind. Es mußte deshalb auf die Berechnung der Keimzahl aus der Größe der Einzelzelle verzichtet werden; sie würde sich ebenso gestalten wie die Berechnung der Gono- und Meningokokken-Suspensionen. Der Multiplikator wurde deshalb nur durch die Formel $M = \frac{z}{h : H}$ festgestellt und war 1356,6. Der Vergleich mit den Multiplikatoren für Gono- und Meningokokken-Aufschwemmungen läßt darauf schließen, daß der Pneumococcus größer ist als die beiden anderen Diplokokkenarten was auch den tatsächlichen Verhältnissen entspricht, wenigstens in bezug auf die Länge des Diplococcus. Bei der Berechnung der Keimzahlen aus den Verdünnungen mit dem Multiplikator 1356,6 ist die Abweichung der Resultate von der ausgezählten Suspension mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor errechnet im Maximum nach der positiven Seite 2,3% und nach der negativen Seite 3,0%. Die Fehler überschreiten also wieder in keinem Fall 10%. (Tabelle XVI)

Tabelle XVI

	Verdünnung	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahlen aus d. Verd. ($\times 10^9$)	Keimzahlen aus d. Verd. d. gez. Keimzahl ($\times 10^9$)	Abweichung d. gem. von dem gez. Keimzahl in %
1)	1 : 1,2	0,08	7,56	0,0106	14,37	14,58	—1,2
2)	1 : 1,5	0,07	7,83	0,0089	12,07	11,66	+2,3
3)	1 : 2,0	0,05	7,75	0,0064	8,68	8,75	—0,4
4)	1 : 2,5	0,04	7,76	0,0051	6,91	7,00	—0,5
5)	1 : 3	0,03	7,61	0,0039	5,29	5,83	—3,0

Wir kommen nun zur Betrachtung der Verhältnisse bei stäbchenförmigen Bakterien mit und ohne Geißeln. Aus dieser Gruppe wurden Suspensionen des Bac. Dysenteriae Shiga-Kruse,

des Bac. Typhi und des Bac. Coli untersucht. Die Suspensionen wurden wieder unter Berücksichtigung der weiter oben angegebenen Richtlinien in der Zählkammer ausgezählt, der $\frac{h}{H}$ Wert der unverdünnten Aufschwemmungen jedesmal durch 10 Messungen bestimmt und dann versucht, aus der Größe des einzelnen Individuums den Keimgehalt durch Rechnung zu bestimmen.

Diese Berechnung gestaltet sich noch verhältnismäßig einfach für den geisellosen Ruhrbazillus, wenn man ihn als einen Zylinder mit dem Rauminhalt $\pi b^2 \cdot 2a$ betrachtet ($2a$ = Höhe und b = Radius der Grundfläche). Z max. wäre dann $\frac{\pi r^2 h}{\pi b^2 \, 2a}$ und x max. $= \frac{\pi r^2 h}{\pi b^2 \, 2a \cdot \pi r^2 H} = \frac{h}{H} \cdot \frac{1}{2\pi a b^2}$. Zur Berechnung von x min. denkt man sich wieder an Stelle des Zylinders ein reguläres sechskantiges Prisma, das mit seinen Seitenflächen in einer Schicht sechs andere berührt und so den Raum lükkenlos ausfüllt. Da der Inhalt eines dieser Prismen $4 a b^2 \sqrt{3}$ ist, so resultiert für x min. der Ausdruck $\frac{h}{H} \cdot \frac{1}{4 a b^2 \sqrt{3}}$. Die Größe eines Ruhrbazillus wird mit $14 \cdot 10^{-5}$ cm für die Längsachse $2a$ und $7 \cdot 10^{-5}$ cm für den Durchmesser auf Grund der in der Literatur dafür angegebenen Durchschnittsmaße angenommen. Der $\frac{h}{H}$ Wert ist 0,0233. Diese Zahlen in die obige Gleichung eingesetzt, ergeben für x max. $= 43{,}26 \cdot 10^9$ und für x min. $= 39{,}22 \cdot 10^9$. Der in der Zählkammer gefundene Wert von $40{,}0 \cdot 10^9$ kommt diesem fast gleich, sodaß man den durch die Rechnung gefundenen Multiplikator 1770 für die Zählung in der Praxis als ausreichend genau bezeichnen kann. Die Tabellen XVII und XVIII geben die 10 Messungen der unverdünnten Suspensionen und die h und H Werte, sowie die Keimzahlen der Verdünnungen und ihre Fehlerbreite wieder. Die durch das Zentrifugierverfahren ermittelten Keimzahlen sind mit Hilfe des Multiplikators 1770 gefunden.

Tabelle XVII

	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahlen ($\times 10^9$)	Abweichung in % von d. mittl. Keimzahl 41,24 $\times 10^9$
1)	0,17	7,28	0,0233	41,24	±0
2)	0,18	7,40	0,0243	43,01	+4,3
3)	0,17	7,50	0,0226	40,00	−3
4)	0,19	8,25	0,0240	42,48	+3
5)	0,18	7,75	0,0232	41,06	−0,4
6)	0,17	7,33	0,0231	40,88	−0,8
7)	0,17	7,39	0,0230	40,71	−1,2
8)	0,17	7,24	0,0234	41,41	+0,4
9)	0,18	7,61	0,0236	41,77	+1,2
10)	0,18	7,70	0,0233	41,24	±0
			Mittel: 0,0233	Mittel: 41,24	

Tabelle XVIII

	Verdünnung	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahlen aus d. Verd. ($\times 10^9$)	Keimzahlen aus d. Verd. d. gez. Keimzahl ($\times 10^9$)	Abweichung d. gem. von der gez. Keimzahl in %
1)	1 : 1,2	0,145	7,47	0,0194	34,33	33,33	+3
2)	1 : 1,4	0,125	7,35	0,0170	30,09	28,57	+5,3
3)	1 : 1,6	0,10	7,44	0,0134	23,71	25,00	−5,1
4)	1 : 1,8	0,09	7,24	0,0124	21,94	22,22	−1,2
5)	1 : 2,0	0,085	7,52	0,0113	20,00	20,20	±0
6)	1 : 2,5	0,07	7,64	0,0091	16,10	16,00	+0,6
7)	1 : 3	0,06	7,72	0,0077	15,62	13,33	+2,1
8)	1 : 4	0,045	7,65	0,0059	10,44	10,00	+4,4

Wesentlich schwieriger ist die mathematische Berechnung der Coli- und Typhus-Suspensionen wegen der Begeißelung dieser Bakterien. Die Geißeln in die Rechnung einzugliedern ohne bestimmte, etwas willkürliche Annahmen, ist nicht möglich. Man kann zunächst mit der Möglichkeit rechnen, daß durch das Zentrifugieren einige, wenn auch nicht alle Geißeln abreißen, da es sich ja um außerordentlich zarte und im Vergleich zu dem Bazillenleib sehr lange Gebilde handelt. Die abgerissenen Geißelfäden würden natürlich ebenfalls sedimentiert werden und eine unkontrollierbare Vergrößerung der Bakteriensäule

bewirken. Nimmt man aber an, daß sie mit dem Bazillenleib trotz schärfsten Zentrifugierens verbunden bleiben und sich fest um ihn legen, so müßte man dies berücksichtigen und die Maße des Keimes etwas größer nehmen, als sie in Wirklichkeit sind. Diese letzte Annahme wurde wegen der damit verbundenen Vereinfachung der Rechnung im folgenden gemacht.

Die Keimzahl der Coli-Suspensionen betrug nach Bürker $47{,}3 \cdot 10^9$. $\frac{h}{H}$ der unverdünnten Suspension war im Mittel 0,0344. In Tabelle XIX sind die h und H Werte der 10 Messungen zusammengestellt.

Tabelle XIX

	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahlen ($\times 10^9$)	Abweichung v. d. mittl. Keimzahl 47,06 $\times 10^9$ in %
1)	0,26	7,55	0,0344	47,06	±0
2)	0,26	7,85	0,0331	45,28	—3,7
3)	0,25	7,35	0,0340	46,51	—1,1
4)	0,26	7,60	0,0342	46,78	—0,5
5)	0,26	7,73	0,0336	45,96	—2,3
6)	0,24	6,51	0,0368	50,34	+6,9
7)	0,25	7,03	0,0363	49,65	+5,5
8)	0,26	7,80	0,0333	45,51	—3,2
9)	0,27	8,12	0,0332	45,41	—3,5
10)	0,26	7,40	0,0351	48,01	+2,0
			Mittel: 0,0344	Mittel: 47,06	

Die Länge 2a eines Bazillus unter Annahme der Zylinderform wurde den in der Literatur angegebenen Durchschnittsmaßen entsprechend mit $30 \cdot 10^{-5}$ cm, sein Durchmesser 2b mit $5 \cdot 10^{-5}$ cm angenommen. Durch die Begeißelung wurde eine Zunahme der Maße um je $0{,}4 \cdot 10^{-5}$ cm gedacht, sodaß für $a = 15{,}2 \cdot 10^{-5}$ und für $b = 2{,}7 \cdot 10^{-5}$ zu setzen wäre. Die Berechnung geht nun wie bei der Dysenterie-Suspension vor sich. Sie ergibt, wenn der Inhalt eines Bakteriums (mit der Länge 2a und dem halben Durchmesser b) $\pi b^2 2a$ ist, für x max. $= \frac{\pi r^2 h}{\pi b^2 2a \cdot \pi r^2 H} = \frac{h}{H} \cdot \frac{1}{2\pi a b^2} = \frac{h}{H} \cdot 1437 \cdot 10^9$

$= 49{,}43 \cdot 10^9$. Zur Berechnung des x min. Wertes wurden ebenfalls dieselben Annahmen gemacht, wie bei der Ruhrbazillen-Suspension. x min. ist demnach $= \frac{h}{H} \cdot \frac{1}{4\,a\,b^2\sqrt{3}}$ $= \frac{h}{H} \cdot 1302{,}7 \cdot 10^9 = 44{,}81 \cdot 10^9$. Der Durchschnittswert beider Multiplikatoren beträgt 1368,2 und die damit für x max. und x min. gefundene Durchschnittskeimzahl $47{,}06 \cdot 10^9$ pro ccm. Es wurden nun zur Untersuchung der Fehlerbreite des Verfahrens wieder Verdünnungen aus der Stamm-Suspension hergestellt und mit der Zentrifugiermethode gemessen. Die Fehler sind wieder nicht größer als 10% beim Vergleich mit den entsprechenden Verdünnungen aus der durch Zählung gefundenen Keimzahl, wie aus Tabelle XX zu sehen ist.

Tabelle XX

	Verdünnung	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahlen aus d. Verd. ($\times 10^9$)	Keimzahlen aus d. Verd. d. gez. Keimzahl ($\times 10^9$)	Abweichung d. gem. von der gez. Keimzahl in %
1)	1 : 1,4	0,20	7,85	0,0254	34,74	33,78	+2,8
2)	1 : 1,8	0,155	7,76	0,0199	27,22	26,27	+3,6
3)	1 : 2,5	0,105	7,66	0,0137	18,74	18,92	−0,9
4)	1 : 3	0,095	7,77	0,0109	14,91	15,76	−5,4
5)	1 : 4	0,065	7,66	0,0084	10,89	11,82	−7,8
6)	1 : 6	0,045	7,60	0,0059	8,07	7,88	+2,4

Unter ähnlichen Annahmen wurde die Berechnung für die Typhus-Suspension durchgeführt. Die Keimzahl nach Bürker betrug $64{,}66 \cdot 10^9$, $\frac{h}{H}$ gemessen an 10 Kapillaren im Mittel 0,0614. Ein Bazillus ist durchschnittlich $16 \cdot 10^{-5}$ cm lang und $8 \cdot 10^{-5}$ cm breit. Eine Zunahme der Maße durch die Begeißelung un je $0{,}4 \cdot 10^{-5}$ cm vorausgesetzt, ergibt für die Länge $16{,}4 \cdot 10^{-5}$ und für die Breite $8{,}4 \cdot 10^{-5}$ cm. Die Berechnung gestaltet sich genau so wie die der Coli-Suspension und ergibt für x max. $67{,}59 \cdot 10^9$ und für x min. $61{,}26 \cdot 10^9$ als Keimdichte pro ccm. Das arithmetische Mittel der Multiplikatoren von x max. und x min. war 1049,9. Zur Kontrolle dieses Wertes wurde der

Multiplikator auch aus der Formel $M = \frac{z}{h : H}$ errechnet und ergab 1053, 1; diese Zahl ist genau, da sie ja mit Hilfe der durch Zählung gefundenen Keimzahl ermittelt ist, unabhängig von der Berechnung aus der Größe eines Keimes.

Schließlich wurde noch eine Cholera-Suspension ausgezählt und ihre Keimdichte auch nach dem Verfahren von Schmidt ermittelt. Nach der Zählung in der Zählkammer befanden sich 66,5 · 10^9 Keime im ccm. Der $\frac{h}{H}$ Wert betrug 0,0339*). Als Durchschnittsmaße eines Cholera-Vibrio werden für seine Länge 2 μ und für die Dicke 0,4 μ angegeben. Die Berechnung ist trotz der mathematisch nicht zu erfassenden Halbschraubenform eines Vibrio und trotz seiner Begeißelung möglich, wenn man wieder zu einigen willkürlichen Annahmen greift. Die Geißeln können in diesem Falle wohl unberücksichtigt bleiben, da jedes Individuum nur eine einzige polständige hat. Würde der Vibrio als gerader zylinderförmiger Körper angesehen und seine Krümmung damit auch vernachlässigt, so würde die Berechnung von x max. und x min. wohl zu hohe Werte liefern, da ein gerader Zylinder natürlich weniger Raum einnimmt als ein schraubenförmig gebogener von derselben Länge. Wir müssen der Krümmungstiefe entsprechend also eine Zunahme des Durchmessers um ca. 0,2 · 10^{-5} cm annehmen, da der Raum zwischen den Polen des Vibrio wahrscheinlich mit Flüssigkeit kapillar angefüllt zu denken ist. Unter Berücksichtigung dieser Hypothesen läßt sich die Rechnung so durchführen wie bei den Bakterien mit gerader Stäbchenform und ergibt für x max. 71,38 · 10^9 und für x min. 64,70 · 10^9. Die Durchschnittszahl aus diesen Grenzwerten 68,04 · 10^9 würde mit der gezählten verglichen einen relativ sehr guten Wert darstellen. Das arithmetische Mittel der Multiplikatoren von x max. und x min. beträgt 2106.

Schließlich wurden auch aus der Cholera-Stamm-Suspension Verdünnungen hergestellt und ihr Keimgehalt mit dem Kapillar-Zentrifugierverfahren ermittelt, (Multiplikator 2106) und die Abweichungen der gefundenen Keimzahlen von den mit den ent-

*) Als Mittel aus 10 Messungen s. S. 39 Tabelle XXIa.

sprechenden Verdünnungsfaktoren aus dem gezählten Keimzahlwert errechneten verglichen. Die Differenz wurde wieder in Prozenten ausgedrückt und ist aus Tabelle XXI zu erkennen.

Tabelle XXI

	Verdünnung	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahlen aus d. Verd. ($\times 10^6$)	Keimzahlen aus d. Verd. d. gez. Keimzahl ($\times 10^9$)	Abweichung d. gem. von der gez. Keimzahl in %
1)	1 : 1,3	0,215	8,01	0,0268	53,78	51,15	+5,1
2)	1 : 1,6	0,18	8,04	0,0211	43,34	41,56	+4,2
3)	1 : 1,9	0,13	7,48	0,0173	34,72	35,00	—0,8
4)	1 : 2,5	0,107	7,52	0,0139	27,89	26,60	+4,8
5)	1 : 3,5	0,075	7,58	0,0098	19,66	19,00	+3,4
6)	1 : 5	0,045	6,86	0,0065	13,04	13,30	—1,9

Tabelle XXIa 10 Messungen der unverd. Cholerasuspension

	h in cm	H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahlen ($\times 10^9$)	Abweichung v. d. mittl. Keimzahl 68,04 $\times 10^9$ in %
1)	0,27	7,94	0,0340	68,23	+0,3
2)	0,26	7,77	0,0334	67,03	—1,4
3)	0,27	8,02	0,0336	67,43	—0,9
4)	0,27	8,00	0,0337	67,63	—0,6
5)	0,28	8,51	0,0329	66,03	—2,9
6)	0,26	7,42	0,0350	70,24	+3,2
7)	0,27	7,96	0,0339	68,04	±0
8)	0,26	7,59	0,0342	68,63	+0,8
9)	0,26	7,74	0,0335	67,23	—1,1
10)	0,26	7,41	0,0350	70,24	+3,2
			Mittel: 0,0339	Mittel: 68,04	

Wie ich schon oben erwähnte, werden die beschriebenen Berechnungen zu den Keimzahlbestimmungen in der Praxis für jeden einzelnen Fall nicht durchführbar sein. Es ist daher wichtig, daß die Rechnung jedesmal auf dieselbe einfache Formel gebracht werden kann, nämlich auf das Produkt aus dem jeweils zu messenden $\frac{h}{H}$ Wert und einer Zahl, die für jede Bakterienart

verschieden sein wird, wegen der ebenfalls differierenden Größe der einzelnen Artindividuen. Die Bestimmung der Keimzahl geht also in der Praxis so vor sich, daß eine oder besser mehrere Kapillaren des Impfstoffes zentrifugiert und die Größen für *h* und *H* abgemessen werden. Der Quotient aus diesen beiden Zahlen mit dem Multiplikator multipliziert ergibt in Milliarden das Maß der gesuchten Keimdichte pro ccm.

Der besseren Übersicht halber sind in folgender Tabelle die Multiplikatoren der untersuchten Suspensionen noch einmal zusammengestellt:

Tabelle XXII

Bakterienart:	Hefe	Staphyl.	Streptok.	Gonokok.	Meningok.	Pneumok.	Dysenterie	Coli	Typhus	Cholera
Multiplikator:	14,08	3463	2911	1703	1599	1356	1770	1368	1053	2106 (×1

Bei der Besprechung der Nachteile und Fehlerquellen ist als erster Nachteil zu erwähnen, daß das Verfahren nur zur Messung dichter Suspensionen geeignet ist, da bei Impfstoffen geringen Keimgehaltes der h Wert zu klein würde, als daß man ihn noch mit Genauigkeit ablesen könnte. Die untere Grenze zählbarer Keimdichten richtet sich natürlich ganz nach der Größe der im Impfstoff suspendierten Mikroorganismen; so wird bei einer Hefesuspension eine genaue Messung noch möglich sein, wenn der Keimzahlwert ca. 50—60 Millionen im ccm beträgt. Bei Bakterien liegt diese unterste Grenzzahl natürlich erheblich höher und ist im Durchschnitt ungefähr 5—6 Milliarden pro ccm. Dagegen spielt eine große Dichte keine Rolle, sie wird vielmehr mit größerer Genauigkeit gemessen werden können, da der *h* Wert entsprechend größer ist und eine kleine Ungenauigkeit beim Ablesen für die Rechnung von geringerer Bedeutung wäre als dann, wenn die Höhe nur einige Zehntel Millimeter betrüge. Damit komme ich zu den Fehlern, die durch Abmessung mit dem Mikrometerstabe entstehen. Sie betragen im Durchschnitt nicht mehr als 5%, wie aus den Tabellen ersichtlich ist und beeinflußen die Genauigkeit der Resultate wenig, besonders dann nicht, wenn man von der Testflüssigkeit mehrere Messungen macht und daraus das Mittel

für die h und H Werte nimmt. Eine andere Fehlerquelle liegt in dem Wirkungsgrad der Zentrifuge. Für das Verfahren sind nur solche Zentrifugen brauchbar, die eine hohe Tourenzahl erreichen und lange ohne Unterbrechung im Gang bleiben können, damit eine möglichst restlose Scheidung der Bakterien aus der Flüssigkeit und eine möglichst enge Packung erzielt werden kann. Wichtig ist auch, die Zentrifuge auslaufen zu lassen und nicht plötzlich zu bremsen, da sonst die Oberfläche der Bakteriensäule abgeschrägt und eine genaue Messung in Frage gestellt würde. Weiterhin ist zu bedenken, daß die Größe des Multiplikators von dem Volumen eines einzelnen Bakteriums abhängt, das innerhalb der verschiedenen Arten nach Stämmen schwanken kann. Man müßte deshalb, um ganz exakte Resultate zu erlangen, den Multiplikator für jeden für Impfstoffe zu verwendenden Stamm einer Bakterienart im einzelnen ausrechnen, was natürlich in der Praxis niemals durchzuführen ist. Da aber mit den bis heute zur Verfügung stehenden Hilfsmitteln keine Keimzählungsmethode gefunden werden kann, die vollkommen genau arbeitet, so wird natürlich diejenige am besten zu brauchen sein, die bei einfacher Ausführung doch relativ gute Resultate liefert.

Zum Schluß sollen noch Versuche beschrieben werden, die mit der Wägungsmethode von Bujwid angestellt wurden. Die Untersuchungen wurden durchgeführt mit Suspensionen derselben Bakterienarten, deren Keimgehalt nach dem Verfahren von Schmidt bestimmt wurde. Das Verfahren von Bujwid beruht darauf, daß eine Schrägagarkultur der zu untersuchenden Keimart mit Hilfe einer analytischen Wage genau gewogen wird, darauf mittels eines Glasspatels oder einer Platinöse eine gewisse Menge der Kultur entnommen und deren Gewicht durch eine zweite Wägung des Agarröhrchens festgestellt wird. Die entnommene Kulturmenge wird mit 10 ccm Na Cl Lösung zu einer Suspension mit dem Trübungsgrad A verarbeitet. Zur Berechnung der zurückgebliebenen Kulturmasse wird der Bakterienrasen mit 2—3 ccm Na Cl Lösung abgespült und in einen zweiten Zylinder mit dem Trübungsgrad B gefüllt. Ein dritter Zylinder von möglichst gleicher Form wie der erste wird darauf mit 10 ccm Na Cl Lösung beschickt und in ihn mit einer 1 : 100

Pipette so lange von dem Inhalt des Zylinders 2 gegeben, bis der Trübungsgrad A erreicht ist. Die Berechnung gestaltet sich folgendermaßen: Es seien a mg Bakterien in Zylinder 1 mit Trübungsgrad A, b ccm Bakteriensuspensionen aus Zylinder 2 waren nötig, um in Zylinder 3 dieselbe Trübung wie in 1 zu erzeugen. Bezeichnet man nun die Kulturmenge im Zylinder 2 mit x, so ist $x : a = 2 : b$, wenn 2 ccm Na Cl-Lösung in Zylinder 2 waren, und $x = 2a : b$. Das Gewicht der gesamten Kulturmenge ist demnach $(x + a)$ mg.

Tabelle XXIII zeigt die Gewichtsmaße der Kultur vor und nach der Entnahme und das Gewicht der entnommenen Mengen. Die Röhrchen wurden 5 mal nacheinander gewogen, um festzustellen, bis zu welchen Grenzen die Maße schwanken. Zwischen der ersten und zweiten Wägung liegen ca. $1^1/_2$ Stunden, zwischen den weiteren Wägungen jedesmal ungefähr 20 Minuten. Es läßt sich ein stetes Abnehmen der Gewichtszahlen feststellen, was wohl auf Verdunstung der Kulturfeuchtigkeit zurückzuführen ist. Bujwid gibt in seiner Arbeit für das Maximum des Gewichtsverlustes 0,5 mg pro 5 Minuten an. Die aus der Tabelle ersichtlichen Differenzen zwischen den einzelnen Wägungsergebnissen lassen im Mittel eine ähnliche Gewichtsabnahme erkennen. Nach der letzten Wägung wurde jedesmal möglichst schnell etwas Kultur entnommen, das Röhrchen sofort wieder gewogen und so diese Fehlerquelle auf ein Minimum herabgesetzt.

Tabelle XXIII

Bakterienart	Gewicht der Kulturen bei 5 aufeinanderfolgenden Wägungen in g					Gewicht nach Entnahmen in g	Gewicht der entn. Menge in mg	Gewicht der zurückgebl. Kultur in mg
Coli	17,866	17,852	17,848	17,846	17,8435	17,8375	6,0	57,14
Typhus	16,667	16,6595	16,6555	16,654	16,6510	16,6460	5,0	33,33
Meningok.	19,3585	19,3525	19,352	19,350	19,3480	19,3425	5,5	20,75
Gonokokken	18,740	18,732	18,7295	18,7245	18,7205	18,7155	5,0	12,5
Pneumok.	19,260	19,2540	19,2515	19,2485	19,2445	19,2388	5,7	33,53
Staphylok.	17,3295	17,3245	17,3235	17,3213	17,3183	17,3110	7,3	35,63
Dysenterie	19,442	19,4395	19,4390	19,4362	19,4325	19,4265	6,5	24,0
Streptokok.	19,3995	19,3935	19,392	19,3910	19,3895	19,3840	5,0	12,22

Die Dichte der in Zylinder 2 enthaltenen Suspension (des mit 2 ccm abgeschwemmten restlichen Kulturrasens) wurden

nach dem Verfahren von Schmidt festgestellt (Tabelle XXIV).

Tabelle XXIV

Bakterienart	Aus 2 Messungen im Mittel h in cm	u. H in cm	$\frac{h}{H}$	Keimzahlen in cm³ ($\times 10^9$)
Coli	0,15	8,26	0,0181	24,76
Typhus	0,10	8,23	0,0121	12,53
Meningokokken	0,04	7,90	0,0050	7,98
Gonokokken	0,035	7,82	0,0044	7,62
Pneumokokken	0,035	7,99	0,0043	3,77
Staphylokokken	0,095	8,02	0,0117	37,98
Dysenterie	0,095	8,65	0,0109	19,29
Streptokokken	0,04	8,18	0,0039	11,35

Nun waren in Zylinder $2n$ mg Bakterien (z. B. für Coli 57,14 mg, s. Tabelle XXIII) in 2 ccm Na Cl-Lösung suspendiert, in einem ccm also $\frac{n}{2}$ mg. Durch das Zentrifugierverfahren wurden a Keime im ccm ermittelt (für Coli $24{,}76 \cdot 10^9$, s. Tabelle XXIV), also enthält 1 mg $\frac{a}{n/2}$ Keime (Tabelle XXV a). Das Durchschnittsgewicht der mit einer Normalöse entnommenen Kulturmengen bei unserer Versuchsreihe war 5,6 mg, die Keimzahl der mit einer Öse entnommenen Kulturmenge also $5.6 \cdot \frac{a}{n/2}$. Tabelle XXV b gibt die Anzahl der in einer solchen Normalöse enthaltenen Keime für die verschiedenen Bakterienarten wieder.

Tabelle XXV

Bakterienart:	Coli	Meningok.	Gonok.	Typhus	Pneumok.	Staphyl.	Dysenterie	Streptok.	
Keimzahl in 1 mg:	0,86	0,76	1,21	0,75	0,22	2,13	1,14	1,85	($\times 10^9$)
Keimz. in mm Öse:	4,81	4,25	6,77	4,20	1,23	11,92	6,38	10,36	($\times 10^9$)

Interessant ist der Vergleich der für 1 mg gefundenen Staphylokokkenzahl ($2{,}13 \cdot 10^9$) mit der von Schmidt theoretisch aus dem Gewicht eines Staphylococcus $= \frac{4}{3} \cdot 4^3 \cdot 1{,}29 \cdot 10^{-15}$ g errechneten von $2{,}9 \cdot 10^9$. Die Werte kommen sich relativ nahe, obwohl sie auf ganz verschiedene Weise gefunden wurden.

Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zur Methodik der Keimzählung von Vaccinen dar. Ihr Ziel kann natürlich nur die Ausarbeitung einer Methode sein, die zuverlässig ist und Keimzahlen liefert, die den tatsächlichen Verhältnissen möglichst entsprechen. Absolut genaue Resultate sind mit keinem der zahlreichen Verfahren zu erzielen, da es sich ja um Zählobjekte handelt, die z. T. auch noch mikroskopisch dem Auge schwer zugängig zu machen sind. Man wird auch nicht in der Lage sein, festzustellen, ob die eine oder die andere Methode bessere Resultate liefert, da ja keine absolut richtige Standardzählung zum Vergleich herangezogen werden kann, eben wegen der Unzulänglichkeit aller Zählverfahren. Solange sich jedoch das Anwendungsgebiet der Keimzählung in der Hauptsache nur auf die Keimzahlbestimmungen von Impfstoffen erstreckt, werden diejenigen Methoden voll ausreichen, deren Handhabung einfach ist und deren Resultate bei Wiederholungen derselben Messungen gleich bleiben, die also auch zuverlässig sind. Die Ausführung des Kapillar-Zentrifugier-Verfahrens ist zweifellos sehr einfach und selbst von völlig Ungeübten in kürzester Zeit zu erlernen. Seine Zuverlässigkeit scheint durch die zahlreichen Tabellen der Arbeit erwiesen zu sein. In dem Institut Emil von Behring wird die Keimdichte der Impfstoffe schon seit längerer Zeit fast ausschließlich durch das beschriebene Verfahren ermittelt, und dadurch ist wohl auch ein hinreichender Beweis für die Brauchbarkeit der Methode in der Praxis gegeben.

Literatur-Verzeichnis.

Bail: Untersuchungen über die Veränderlichkeit von Cholera-Vibrionen. Zentr. f. Bakt. 1. Abt. Bd. 77, 3.

Bujwid, O.: Eine neue Methode der Bestimmung von Bakterienmengen. Zentr. f. Bakt. 1916, Bd. 77, 3.

Dichtl, G.: Bestimmung der Keimzahl in Bakterien-Reinkulturen. Arch. f. Hyg. 89, 1—3.

Dold, H.: Kritische Betrachtungen über Bestimmung und Bewertung der Keimzahl bakterieller Impfstoffe. D. m. W. 1925 Nr. 45.

Fränkel, Friedberger etc.: Pathogene Bazillen. Handbuch der Hygiene Bd. 3.

Fries, V. A.: Eine einfache Methode zur genauen Bestimmung der Bakterienmengen in Bakteriensuspensionen. Zentr. f. Bakt. O. I 1921, 86.

Gates, L.: A method of standardizing bacterial suspensions.

Gotschlich: Pathogene Vibrionen. Handbuch der Hygiene, Bd. 3.

Jentzsch-Graefe, F.: Über Dunkelfeld und Ultramikroskopie. Kraus-Uhlenhuth, Handbuch der mikrob. Technik.

Klein, A.: Eine neue mikroskopische Zählmethode der Bakterien. Zentr. f. Bakt. O. I 1900, 27.

Klein, W.: Die Methoden der Keimzählung. Kolle-Wassermenn, Handbuch der pathog. Mikroorganismen.

Koch, K.: Ein neuer Apparat zum Zählen von Kolonien. Zentr. f. Bakt. O. I 1925 Bd. 96.

Kolle, W. und Hetsch, H.: Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten.

Krombholz, E. und Lorenz, W.: Über eine exakte Methode der mikrobiellen Titerbestimmung. Zentr. f. Bakt. I. Abt. O. 1929 Bd. 114.

Kruse und Rittershaus: Dysenterie und Pseudodysenterie. Z. f. Hyg. und Inf. 1907 Bd. 57.

Lehmann und Neumann: Atlas und Grundriß d. Bakteriol.

Müller: Pathogene Fadenpilze, Schimmelpilze, Blastomyceten. Handbuch der Hygiene.

Müller P. Th.: Allgemeine Morphologie d. Bakt., Hefen, Faden- und Schimmelpilze. Handbuch der Hygiene 3. Bd. I. Abt..

Muntner, S.: Über Bakt.-Zählungen und Größenmessungen in Aufschwemmungen mittels des Kleinmann'schen Nephelometers. Z. f. Hyg. u. I. 106, 50. 1925.

Muntsch, O.: Ein Beitrag zur kult. Keimzählmethode. Zentr. f. Bakt 1929, Bd. 114, 4—6.

Neisser, M.: Bakt. Zählung. Handbuch der Hyg. 3. Band.

Neisser, M. und Klein, W.: Keimzählung. Kraus-Uhlenhuth, Handbuch der mikrobiol. Technik.

Neisser, M. und Gins, H. A.: Pathogene Kokken. Handbuch der Hygiene Bd. 3, 2.

Reichert, K.: Über die Sichtbarmachung d. Geißeln und Geißelbewegung d. Bakterien. Zentr. f. Bakt. Bd. 51, 1.

Schmidt, H.: Ein Verfahren, die maximalen und minimalen Keimzahlwerte zu bestimmen. Z. f. Hyg. u. Inf. 1926, 106.

Seitz, A.: Einführung in die Mikrobiologie und Infektionskrankheiten.

Sommer, H.: Keimzählung in Bakterienimpfstoffen. Zentr. f. Bakt. O. I 1923, 90.

Stigell: Über die spezifischen Gewichte einiger Bakterien. Zentr. f. Bakt. Bd 45.

Strauß, W.: Objektive Nephelometrie mittels des Moll'schen Trübungsmessers, demonstriert am Beispiel der Bakterienzählung. Zentr. f. Bakt. 1930, I. Abt. O. Bd 115.

Wámoscher, L.: Bakterienzählung im Dunkelfeld, Klin. Wochenschrift 1927, 6 Nr. 45.

v. Wikullil: Zur Bestimmung der Keimzahl bakterieller Impfstoffe. Zentr. f. Bakt. 1926, I. Abt. 100.

Lebenslauf.

Am 27. Oktober 1905 wurde ich, Erich Fischer, als Sohn des jetzigen Verwaltungsinspektors Paul Fischer und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Liebecke, zu Potsdam geboren. Nach fünfjähriger Volksschulzeit in Brieg (Schles.) und Saarburg (Lothr.) besuchte ich das humanistische Gymnasium in Saarburg, Stendal und Kassel und erhielt Ostern 1926 das Reifezeugnis des Wilhelmsgymnasiums zu Kassel. Seitdem studierte ich in Marburg Zahnheilkunde. Ende des Wintersemesters 1927/1928 bestand ich die zahnärztliche Vorprüfung mit „gut“ und legte im Winter 1929/1930 die zahnärztliche Staatsprüfung ebenfalls mit „gut“ ab. Während meiner ganzen Studienzeit war ich in Marburg.

Am Schlusse der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Schmidt für die freundliche Überlassung des Themas und die liebenswürdige Unterstützung bei seiner Gestaltung meinen ergebensten Dank aussprechen.

Akademische Buchdruckerei F. Straub (Inh. G. Gaigl) München